

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Biológicas



* 5 3 0 9 5 3 6 7 0 3 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

INTERACCION ENTRE LA PROTEINA RepB Y EL ORIGEN DE REPLICACION DE pLS1

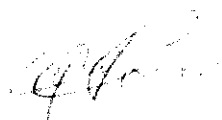
MIRIAM MOSCOSO NAYA

Madrid, 1996

INTERACCION ENTRE LA PROTEINA RepB Y EL ORIGEN DE REPLICACION DE pLS1

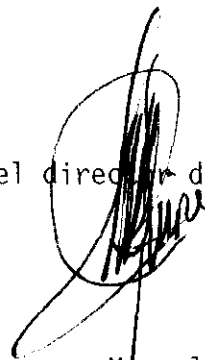
Tesis Doctoral presentada por Miriam Moscoso Naya,
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Febrero, 1996



Miriam Moscoso Naya

Vº Bº, el director de trabajo



Manuel Espinosa

Profesor de Investigación
(CIB, CSIC)

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I
Facultad de Ciencias Biológicas**

*A mis padres y,
por supuesto, a Manolo.*

Llegado el momento en que el esfuerzo y trabajo de estos últimos años se concretan en este pequeño volumen, no puedo dejar de mencionar a aquellas personas que de una forma u otra me han prestado su ayuda.

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a Manuel Espinosa, director de esta Tesis y quien me ha enseñado casi todo lo que sé sobre el "mundillo" de la Ciencia. Agradecer, además, a todo el grupo de Genética Molecular de la Facultad de CC Biológicas, haber aceptado esta Tesis.

A Gloria del Solar y Adela de la Campa, cuyos trabajos han constituido la base sobre la que se asienta esta Tesis. A Gloria, además, por iniciarme en la técnicas de laboratorio y en las "discusiones científicas".

A Paloma López, que haciéndome un hueco en su apretada agenda, me ha brindado siempre buenas ideas y oportunos consejos. A Germán Rivas, por el interés prestado en mi trabajo. A Guillermo Giménez, por su apoyo. Y a Javier Varela y Ramón Eritja, por sintetizar puntualmente todos los oligos (y son muchos) con los que he trabajado.

En segundo lugar, me gustaría recordar a todos mis compañeros. A mis primeros compañeros del Laboratorio: Antonio, Pepe y Asun, por sus buenos consejos. Y a Christophe, por su amistad y hospitalidad.

A Gaby, por haber pensado en mí y recomendarme para trabajar en el Laboratorio. A Paloma, por madrugar tanto y ser siempre tan solícita. A Ana, por sus "comeduras de coco" y por ayudarme, sin rechistar, con el "ir y venir" de las figuras de esta Tesis. A Mónica y Félix, por compartir conmigo el "síndrome del becario". A Joaquín y Leda, por su cariño y comprensión cuando más lo necesitaba. Y a Manuel, por ayudarme a resolver el "papeleo" del Doctorado.

Y por supuesto, a Maite, por su ayuda técnica y buen ánimo, por enseñarme a "pinchar" los gradientes de CsCl. A Maritere, por sus historias y por tener esos nietos tan maravillosos. A Reme y Pedro, por su apoyo y buen humor.

Agradecer también, la atención prestada por el Servicio Técnico del CIB, en especial a Aurelio y Vicky, que se han visto saturados de trabajo por mi culpa.

Me gustaría hacer una mención especial a mi familia, por soportarme todo este tiempo. A Gladys, por resolver mis problemas informáticos. A Jose, por estar a mi lado y hacerme reír, olvidando, muchas veces, los problemas que surgen en este trabajo.

Finalmente, me queda decir que este trabajo ha sido financiado, en su mayor parte, por una beca del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

A todos, Muchas Gracias.

Miriam

INDICE

INTRODUCCIÓN 1

1. Plásmidos: definición e importancia biológica	2
2. Mecanismos de replicación plasmídica	3
2.1. Replicación tipo theta	3
2.2. Replicación por desplazamiento de hebra	6
2.3. Replicación tipo círculo rodante	7
2.4. Replicación dirigida por proteínas terminales	7
3. Sistemas de control de la replicación plasmídica	8
3.1. Control mediado por RNAs antisense	9
3.2. Control mediado por proteínas represoras	11
3.3. Control mediado por iterones	12
3.4. Control mediado por RNAs antisense y proteínas	12
4. Replicación tipo círculo rodante	15
4.1. Origen de replicación de la cadena líder (<i>dso</i>)	18
4.2. Proteínas de replicación (Rep)	19
4.3. Origen de la replicación de la cadena retrasada (<i>sso</i>)	21
4.4. Modelo de replicación por círculo rodante	22
5. Familia de pLS1	26

OBJETIVOS 32

Planteamiento de la Tesis	33
---------------------------------	----

MATERIALES 34

1. Estirpes bacterianas	35
2. Plásmidos	35
3. Bacteriófagos	40

4. Proteínas	40
5. Medios de cultivo	40
5.1. Medio de cultivo de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	40
5.2. Medios de cultivo de <i>Escherichia coli</i>	41
5.3. Medio de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i>	42
6. Reactivos y otros productos	42

MÉTODOS 43

1. Crecimiento y conservación de las estirpes bacterianas	43
2. Preparación y transformación de células competentes	44
3. Preparaciones de DNA	45
3.1. Preparaciones de DNA total	45
3.2. Minipreparaciones de DNA plasmídico	45
3.3. Preparación de plásmidos puros	46
4. Manipulaciones enzimáticas del DNA	47
5. Elución y purificación de fragmentos de DNA	47
6. Purificación de oligonucleótidos	48
7. Secuenciación de DNA	49
8. Mutagénesis dirigida	49
9. Electroforesis de DNA	50
9.1. Geles de agarosa	50
9.2. Geles de poliacrilamida nativos	51
9.3. Geles de agarosa alcalinos	51
9.4. Geles mixtos de agarosa-acrilamida	52
9.5. Geles mono- y bidimensionales con cloroquina	52
9.6. Geles de secuenciación	53
10. Determinación del número de copias plasmídico	53
11. Ensayos de estabilidad e incompatibilidad plasmídica	54
11.1. Ensayos de estabilidad	54
11.2. Ensayos de incompatibilidad	55

12. Marcaje radiactivo del DNA	56
12.1. Preparación de sondas radiactivas	56
12.2. Marcaje de fragmentos de DNA en 3'	56
12.3. Marcaje de oligonucleótidos en 5'	57
12.4. Marcaje de oligonucleótido en 3'	57
13. Transferencia de DNA a filtros de nitrocelulosa	57
14. Electroforesis de proteínas	58
15. Hiperexpresión de genes bajo el promotor ϕ10 del fago T7 y extracción de proteínas totales	59
16. Precipitación y valoración de proteínas	61
17. Purificación de RepB	62
18. Determinación de la concentración de RepB y cálculo de su coeficiente de extinción	64
19. Ensayos de actividad de RepB	65
19.1. Ensayos de actividad de RepB sobre DNA superenrollado	65
19.2. Ensayos de actividad de RepB sobre oligonucleótidos	66
20. Aislamiento de complejos proteína-DNA covalentes	66
21. Análisis de la quiralidad del fosfato implicado en la unión de la proteína RepB al DNA	68
22. Ensayos de retardo en gel	71
22.1. Curvaturas intrínsecas: ensayos en ausencia de RepB	72
22.2. Curvaturas inducidas: ensayos en presencia de RepB	72
22.3. Complejos RepB-DNA	72
23. Ensayos de unión proteína-DNA en filtro	73
24. Determinación de la masa molecular de RepB mediante equilibrio de sedimentación	73
25. Análisis por ordenador	74

RESULTADOS 75

1. Definición del origen mínimo de replicación de la hebra líder de pLS1	76
2. El <i>dso</i> es un determinante de incompatibilidad	81

3. RepB es capaz de actuar en <i>trans</i>	84
4. Purificación de la proteína RepB	93
5. Coeficiente de extinción molar y composición de aminoácidos de RepB ..	96
6. Determinación de la masa molecular de RepB mediante equilibrio de sedimentación	97
7. Actividad tipo topoisomerasa I de RepB: condiciones óptimas para su actividad	97
7.1. Condiciones de análisis de productos de reacción	100
7.2. Concentración de sustrato	101
7.3. Concentración de proteína	102
7.4. Temperatura de incubación	102
7.5. Influencia de la concentración de KCl en el tampón de incubación sobre la actividad de RepB	103
7.6. Influencia de cationes en la actividad de RepB	104
7.7. Actividad de RepB en presencia de camptotecina	104
7.8. Actividad de RepB en presencia del represor transcripcional CopG	106
7.9. Actividad de RepB en presencia de nicotinamín-mononucleótido (β -NMN)	108
7.10. Actividad de RepB en presencia de detergentes	109
7.11. Cinéticas de la actividad de RepB	109
7.12. Otros parámetros	110
8. pLS1 presenta un incremento en su número de copias en cultivos de <i>B.subtilis</i> crecidos a 45°C	114
9. <i>In vitro</i> , los iterones no son necesarios para la actividad de corte/cierre de RepB sobre DNA superenrollado	116
10. Curvaturas intrínsecas presentes en el <i>dso</i> de pLS1. Influencia de RepB	125
11. Identificación de los productos FII + FI' generados por RepB	129
12. RepB parece reconocer con distinta eficiencia a plásmidos derivados de pMV158	134
13. Actividad de RepB sobre oligonucleótidos monocatenarios	143

14. Especificidad del sitio de corte de RepB	148
15. RepB no presenta actividad detectable sobre DNA lineal bicatenario ..	151
16. RepB tiene actividad nucleotidil-transferasa. Análisis de la actividad de cierre de RepB sobre oligonucleótidos	156
17. La unión de RepB a DNA no parece estar mediada por intermediarios covalentes estables	160
17.1. Precipitación de complejos proteína-DNA	161
17.2. Captura de complejos proteína-DNA	161
17.3. Retardo de fragmentos de restricción	163
17.4. Retardo de oligonucleótidos	164
17.5. Unión proteína-DNA en filtros	166
18. Análisis de la quiralidad del fosfato que interviene en la unión de la proteína RepB al <i>dso</i> de pLS1	168
19. RepB reconoce los <i>dso</i> de plásmidos relacionados	178
20. Dominios de la proteína RepB. Hiperexpresión de proteínas delecionadas en sus extremos N- y C-terminal	185
20.1. Deleción del gen <i>repB</i> en la región 5'	185
20.2. Deleción del gen <i>repB</i> en la región 3'	189
20.3. Hiperexpresión de las proteínas RepB delecionadas en sus extremos N- y C-terminal	190
21. Definición del sitio activo de RepB. Mutagénesis dirigida al residuo Tyr99	192
21.1. Mutagénesis dirigida al codón Tyr99 de RepB	193
21.2. Hiperexpresión de RepBY99F y RepBY99S	195
21.3. Purificación de las proteínas RepBY99F y RepBY99S	195
22. Actividad de las proteínas RepB mutantes	197
23. Unión de las proteínas RepB silvestre y mutantes a la región <i>bind</i> del <i>dso</i>	200
24. Las mutaciones Y99F e Y99S en RepB no son rescatables en pLS1 ...	204

DISCUSIÓN	206
1. Origen de replicación del plásmido pLS1	207
2. RepB, proteína iniciadora de la replicación de pLS1	216
3. Iniciación y terminación de la replicación mediante círculo rodante	225
4. Familia de pLS1	233
CONCLUSIONES	242
BIBLIOGRAFÍA	247

ABREVIATURAS

A	absorbancia
aa	aminoácidos
Ap	ampicilina
Ap^r	resistentes o resistencia a ampicilina
ATP	adenosina 5'-trifosfato
βME	β -mercaptoetanol
βNMN	β -nicotinamin mononucleótido
BFB	azul de bromofenol
BSA	seroalbúmina bovina
CBB	azul brillante de Coomassie
Ci	curios
CCC	circular covalentemente cerrado
Cm	cloramfenicol
CMC	concentración micelar crítica
Cm^r	resistentes o resistencia a cloramfenicol
coord.	coordenada(s)
cpm	cuentas por minuto
c.s.p.	cantidad suficiente para
ctRNA	RNA contratranscrito
Da	daltons
dATP	desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	desoxicitidina 5'-trifosfato
ddATP	2',3'-didesoxiadenosina 5'-trifosfato
dGTP	desoxiguanosina 5'-trifosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNasa	desoxirribonucleasa
dNTP	desoxinucleósido 5'-trifosfato
DO	densidad óptica
dsDNA	DNA de doble cadena
dso	origen de cadena doble
DTE	ditioeritritol
DTT	ditiotreitól
dTTP	desoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA	N,N,N',N'-etilendiamino tetraacetato disódico
EG	etilenglicol
Em^r	resistentes o resistencia a eritromicina
EtBr	bromuro de etidio
F	faradio(s)
Fig.	figura(s)
g	fuerza centrífuga relativa (RCF)
h	hora(s)
HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperacin-N'-2-etanosulfónico
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HTH	motivo de unión a DNA α hélice-vuelta- α hélice
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

l	litro(s)
LZ	motivo de dimerización cremallera de leucinas
M	molar
min	minuto(s)
MOPS	ácido morfolinopropanosulfónico
MPa	megapascal(es)
mRNA	RNA mensajero
N	número de copias plasmídico
Na-DOC	desoxicolato sódico
nm	nanómetros
nt	nucleótidos
OC	circular abierto
ori	origen de replicación
PAA	poliacrilamida
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	pares de bases
PDE	fosfodiesterasa de veneno de serpiente
Pol IK	fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de <i>E. coli</i>
PSA	persulfato amónico
RC	replicación tipo círculo rodante
Rep	proteína iniciadora de la replicación
Rif	rifampicina
RNA	ácido ribonucleico
RNasa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en geles de PAA en presencia de SDS
Sm	estreptomycin
SSB	proteína de unión a ssDNA de <i>E.coli</i>
ssDNA	DNA de cadena sencilla
sso	origen de cadena sencilla
t.a.	temperatura ambiente
Tc	tetraciclina
Tc'	resistentes o resistencia a tetraciclina
TCA	ácido tricloroacético
TEAA	triethylamino acetato
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlen-diamina
T4 PNK	T4 polinucleótido kinasa
Tris	trihidroximetil-amino-metano
tRNA	RNA de transferencia
u	unidades
u.f.c.	unidades formadoras de colonia
UV	luz ultravioleta
V	voltios

INTRODUCCION

1. PLÁSMIDOS: DEFINICIÓN E IMPORTANCIA BIOLÓGICA

La información genética de las bacterias está localizada, esencialmente, en una molécula bicatenaria de DNA, el cromosoma. En muchos casos, esta información se encuentra acompañada por otras moléculas de DNA capaces de replicar de forma autónoma, los plásmidos. Estos elementos genéticos extracromosómicos se han aislado fundamentalmente en organismos procarióticos y en algunos eucariotas inferiores. La mayoría de los replicones plasmídicos caracterizados hasta la fecha son moléculas circulares de DNA bicatenario, aunque se han descrito plásmidos lineales (Hinnebush y Tilly, 1993). Los plásmidos replican como entidades independientes dentro de la célula aunque, para ello, usan factores del huésped. Una característica de los plásmidos es su replicación controlada, de forma que su número de copias debe duplicarse en el momento de la división celular (revisado por Nordström y Austin, 1989). Por ello, todos los plásmidos poseen sistemas para controlar su replicación. Muchos replicones naturales poseen, además, sistemas de partición que aseguran la correcta distribución de sus copias entre las células hijas en el momento de la división celular (Kittell y Helinski, 1992). En algunos casos, existen sistemas que aseguran la muerte de las células que pierden el replicón (sistemas "asesinos"), consiguiendo así el mantenimiento estable de los plásmidos en la totalidad de la población celular. Además de los sistemas de replicación y control, muchos plásmidos poseen genes implicados en diferentes procesos como son resistencias a antibióticos, fijación de nitrógeno, virulencia, catabolismo de sustancias fenólicas, resistencias a metales pesados, etc. Los plásmidos pueden ser vehículos para el clonaje y expresión de genes que codifiquen productos de interés industrial o biotecnológico.

Los plásmidos poseen capacidad para integrarse, mediante recombinación homóloga o ilegítima, en otros replicones e incluso en el cromosoma del huésped. Pueden ser receptores y donadores de transposones y secuencias de inserción. Muchos plásmidos se pueden transferir por sí mismos de un huésped a otro mediante conjugación, contribuyendo con ello a la diseminación horizontal de genes entre microorganismos. Además, juegan un papel clave en la transferencia de información a plantas superiores. Su importancia ecológica y evolutiva es indiscutible. Por último,

el conocimiento de los plásmidos ha contribuido al desarrollo de la Biología Molecular y la Biotecnología. Gracias a que los plásmidos son elementos dispensables a la célula huésped y que, aparentemente, poseen una organización genética simple, son los candidatos ideales para el estudio a nivel molecular de interacciones entre moléculas de DNA y/o RNA, interacciones proteína-DNA, topología del DNA, expresión de genes, y para la ampliación de conocimientos en los procesos de conjugación, recombinación, control y replicación del DNA.

2. MECANISMOS DE REPLICACIÓN PLASMÍDICA

Los plásmidos poseen como mínimo un origen de replicación, que se puede definir como la región mínima donde se produce la iniciación de la replicación de la cadena líder, y un sistema *cop*, para el control de la frecuencia de iniciación de la replicación. El mantenimiento de un número de copias constante dentro de un determinado huésped es una característica común para todos los plásmidos. Esto implica que si dos plásmidos comparten elementos comunes involucrados en su replicación estable y/o en su mantenimiento, serán incapaces de coexistir en ausencia de presión selectiva. Como consecuencia, ambos replicones se segregarán dentro de la población bacteriana, es decir serán incompatibles.

Los mecanismos de replicación conocidos basan sus diferencias en la iniciación de la replicación y en las distintas estructuras que adoptan los intermediarios de replicación. Existen cuatro mecanismos generales de replicación plasmídica: replicación tipo theta, por desplazamiento de hebra, tipo círculo rodante y replicación dirigida por proteínas terminales (Kornberg y Baker, 1992).

2.1. Replicación tipo theta

La replicación tipo theta fue el primer mecanismo de replicación plasmídica conocido. Es característica de la mayoría de los plásmidos circulares de bacterias gram(-), aunque también ha sido descrito en el grupo de incompatibilidad Inc18 de plásmidos de bacterias gram(+) (Bruand *et al*, 1991). Este tipo de replicación implica la síntesis de un RNA cebador usando como molde una de las hebras parentales, una

vez que han sido separadas. El RNA cebador o "primer" será el que proporcione el grupo 3'-OH libre necesario para la síntesis del DNA, efectuada por las DNA polimerasas. Esta síntesis es continua en una de las hebras y discontinua en la otra (cadenas líder y retrasada, respectivamente), y parece que ocurre de una forma acoplada entre ellas (Selik *et al*, 1987). Los intermediarios de este tipo de replicación, sea uni- o bidireccional, muestran formas tipo *theta* (Θ) en imágenes de microscopía electrónica, debido a la separación de las hebras parentales y al avance de la horquilla de replicación. Los plásmidos que siguen este mecanismo de replicación se pueden dividir en dos grupos, según dependan o no de la DNA polimerasa I para la iniciación de la síntesis del DNA (del Solar *et al*, 1995b).

a) Replicones dependientes de la DNA polimerasa I. Este grupo no codifica una proteína iniciadora de la replicación y depende de la RNA polimerasa del huésped para la síntesis del RNA cebador de la cadena líder o de un precursor de éste. Además, requiere la DNA polimerasa I al comienzo de la síntesis del DNA (Staudenbauer, 1978; Kornberg y Baker, 1992). El mecanismo mejor conocido es el del replicón Cole1: la replicación se inicia a partir de la separación de las hebras de DNA y de la síntesis de un RNA precursor del "primer" ("pre-primer") por la RNA polimerasa del huésped, que será procesado por la RNasa H para dar lugar al RNA "primer" (Itoh y Tomizawa, 1980). Este "primer" proporciona el grupo 3'-OH específico, usado por la DNA polimerasa I para la síntesis del DNA inicial. Posteriormente, la DNA polimerasa III continúa la elongación de la cadena. La síntesis discontinua de la cadena retrasada se inicia al quedar expuesto el sitio para el ensamblado del primosoma (*pas*), que permite la entrada de la helicasa DnaB y la acción de la primasa DnaG, y finaliza por la presencia de una señal de terminación, *terH* (Minden y Marians, 1987), localizada cerca del sitio *pas*.

b) Replicones independientes de la DNA polimerasa I. Los plásmidos pertenecientes a este grupo codifican una proteína iniciadora de la replicación (proteína Rep), que se une a secuencias directamente repetidas del DNA (iterones). El origen de replicación (*ori*) se caracteriza por poseer, además, una región rica en secuencias A+T que contiene dos o más sitios para la interacción de DnaB/DnaC y uno o más sitios específicos para la unión de la proteína DnaA. La iniciación requiere el ensamblaje

del primosoma en el origen de replicación: la proteínas Rep y DnaA, unidas a sitios específicos del DNA, facilitan la apertura de la doble hélice en la región rica en A+T y la entrada del complejo DnaB/DnaC en el origen. La reacción de síntesis se lleva a cabo mediante la acción de la DNA polimerasa III y otras proteínas del huésped. La terminación se produce debido al reconocimiento de secuencias específicas por determinados factores que detienen la horquilla de replicación (Kuempel *et al*, 1989).

Uno de los primeros casos conocidos y más estudiado es el del plásmido R1 del grupo de incompatibilidad IncFII: la proteína RepA codificada por el plásmido se une al núcleo central de dos secuencias parcialmente palindrómicas (Giraldo y Díaz, 1992). Mediante interacciones cooperativas proteína-proteína, se adicionarían nuevas moléculas de RepA que van a facilitar la apertura de las hebras en la región A+T y a dirigir la unión de DnaA a la caja *dnaA* del origen de replicación (Masai y Arai, 1987). Se ha mostrado que, tanto *in vivo* como *in vitro*, las interacciones de RepA en el *ori* promueven la entrada de la primasa DnaG, quien sintetiza un RNA cebador para la iniciación de la síntesis de la cadena líder, en un sitio localizado 400 pb "corriente abajo" del sitio de unión de RepA (Masai y Arai, 1989).

En los plásmidos P1 y R6K, la unión de las proteínas iniciadoras (RepA y π , respectivamente) a los iterones del origen, genera un complejo nucleo-proteico que va a favorecer la apertura de hebras del origen por DnaA (Mukherjee *et al*, 1985; Mukhopadhyay *et al*, 1993). En otros plásmidos como pSC101, la unión del factor de integración del huésped (proteína IHF) a sitios localizados en la región A+T, promueve curvaturas en el DNA que facilitan interacciones entre moléculas de DnaA unidas a sitios separados por 200 pb (Stenzel *et al*, 1991). En el caso de R6K, la unión de IHF parece alterar la estructura de la zona adyacente a los iterones, reduciendo así la actividad inhibitoria de la proteína π (Kelley *et al*, 1992). Un caso particular lo constituye la proteína multifuncional Gp α del fago P4, que posee, en diferentes dominios de la proteína, las actividades helicasa 3'→ 5', primasa y de unión a DNA (Ziegelin *et al*, 1993). De esta manera, la iniciación de la replicación de P4 es independiente de factores del huésped (Linqvist *et al*, 1993).

Varias de las proteínas Rep de este tipo de plásmidos presentan el motivo de

cremallera de leucinas (LZ), que ha sido descrito como motivo de dimerización de varios factores de transcripción eucarióticos (Landschultz *et al*, 1988). Este motivo está presente en las proteínas Rep de pPS10, pSC101, P1, F y R6K. Se ha observado que mutaciones producidas en el motivo LZ pueden conducir a diversos efectos: i) afectar a la activación de los orígenes de replicación, como en el caso de R6K (Miron *et al*, 1992); ii) incrementar el número de copias plasmídico, como ocurre en pSC101 (Ingmer y Cohen, 1993); iii) disminuir la eficiencia de unión de la proteína a su operador y iv) afectar al número de copias e incluso al rango de huésped, como sucede en pPS10 (García de Viedma, 1994; Fernández-Tresguerres *et al*, 1995). Además del motivo LZ, en las proteínas Rep no se han encontrado motivos típicos de unión a DNA, con la excepción del motivo α hélice-vuelta- α hélice (HTH) descrito para la proteína RepA de pPS10 (García de Viedma, 1994). Para las proteínas TrfA de RK2 y π de R6K, se ha observado que mutaciones en su región C-terminal afectan a la capacidad de unión a DNA (Cereghino *et al*, 1994; Greener *et al*, 1990). La mayoría de las proteínas Rep de los plásmidos que contienen iterones reprimen transcripcionalmente su propia síntesis. Tras la unión a los iterones tendrían lugar interacciones proteína-proteína que serían capaces de regular negativamente la frecuencia de iniciación de la replicación (Nordström, 1990; Kittell y Helinski, 1992).

2.2. Replicación por desplazamiento de hebra

En este tipo de replicación, que ha sido caracterizado para el plásmido RSF1010 del grupo IncQ (Scherzinger *et al*, 1991), la iniciación se produce a partir de dos secuencias palindrómicas que contienen dos sitios de iniciación de monohebra (*ssi*): *oriR* y *oriL*, localizados en cadenas opuestas dentro del *oriV*.

La replicación de RSF1010 es dependiente de tres proteínas codificadas por el plásmido: una proteína que reconoce el origen (RepC), una helicasa 5' \rightarrow 3' (RepA), y una primasa (RepB; Haring y Scherzinger, 1989). La proteína RepC se une a los 5 iterones del origen y promueve la entrada de la helicasa RepA para la separación de las hebras, con lo cual quedan expuestos los sitios *ssi* del *oriR* y *oriL*. A continuación, se produce la entrada de la primasa RepB para iniciar la replicación (Miao *et al*, 1993). La replicación se realiza a partir del *oriR* u *oriL*, o de ambos orígenes a la vez, de una manera continua y desplazando la hebra que no es replicada,

formando con ello un lazo en forma de "D". Si la iniciación se produce en un solo origen, los productos finales son una molécula de dsDNA circular superenrollada y un círculo de ssDNA desplazado; si se produce en ambos orígenes, los productos son moléculas de dsDNA circular superenrollado.

2.3. Replicación tipo círculo rodante

El modelo actual para este tipo de replicación plasmídica se basa en el modelo descrito para bacteriófagos de cadena sencilla (Baas y Jansz, 1988). Es característico de muchos plásmidos de pequeño tamaño y alto número de copias de bacterias gram(+). De hecho, en un principio se pensaba que era exclusivo de este tipo de plásmidos, aunque ya se han descrito varios ejemplos de replicación por círculo rodante (RC) en plásmidos aislados de bacterias gram(-) (Gielow *et al*, 1991; Gigliani *et al*, 1993; Kleanthous *et al*, 1991; Yasukawa *et al*, 1991).

La replicación se realiza de un modo unidireccional y asimétrico, ya que la síntesis de la cadena líder y retrasada están desacopladas. La iniciación de la replicación la lleva a cabo una proteína codificada por el plásmido, denominada genéricamente Rep, que introduce una rotura específica en la hebra(+), dentro del origen de cadena doble (*dso*). El ataque mediado por Rep, genera un grupo 3'-OH libre que será usado como "primer" por la DNA polimerasa III, para la síntesis de la cadena líder. La cadena(+) parental va siendo desplazada a medida que se sintetiza la cadena(+) nueva hasta alcanzar la región *dso* inicial. A continuación, se produce una rotura y posterior unión de la cadena parental desplazada, que hasta este momento habría estado covalentemente unida a la cadena de nueva síntesis. La terminación de la síntesis de la cadena líder genera una molécula dsDNA completa y un intermediario de ssDNA (te Riele *et al*, 1986). La conversión del ssDNA circular de la cadena parental a dsDNA se realiza a partir del reconocimiento del origen de cadena sencilla (*sso*) por factores del huésped (Novick, 1989). El mecanismo de replicación RC se discutirá con más detalle más adelante, ya que es el mecanismo seguido por el plásmido pLS1, objeto de nuestro trabajo.

2.4. Replicación dirigida por proteínas terminales

Este tipo de replicación es característico de plásmidos lineales que tienen una

proteína unida covalentemente a sus extremos 5'. El mecanismo parece ser similar al descrito para el fago $\phi 29$ de *Bacillus subtilis* (Salas, 1991): la replicación se inicia por la interacción de una proteína terminal libre con la proteína terminal unida a los extremos 5' del DNA, siendo aquélla la que proporciona el grupo 3'-OH que será usado por la DNA polimerasa del fago para incorporar el primer nucleótido. Se ha propuesto un nuevo mecanismo en el cual, el primer nucleótido incorporado correspondería al segundo del DNA molde (Méndez *et al*, 1992). El complejo de iniciación (formado por la proteína terminal, la DNA polimerasa y el DNA) se deslizaría hacia atrás sobre la hebra de DNA localizando correctamente el nucleótido en la posición 1 del molde. Por desplazamiento de hebra, se irían incorporando los siguientes nucleótidos en la elongación.

Algunos plásmidos lineales con proteínas terminales unidas a sus extremos 5' (como el plásmido pSLA2 de *Streptomyces rochei*; Chang y Cohen, 1994) parecen constituir una excepción al anterior modelo: su replicación se produce bidireccionalmente a partir de un origen de replicación interno. En el caso de pSLA2, los intermediarios de replicación son moléculas dúplex lineales con extremos 5' recesivos; los extremos 3' protuberantes podrían servir como moldes para la síntesis de la cadena retrasada, cuyo "primer" se lo proporcionaría la proteína terminal unida covalentemente al extremo 5' del DNA (Chang y Cohen, 1994).

3. SISTEMAS DE CONTROL DE LA REPLICACIÓN PLASMÍDICA

Durante el crecimiento exponencial de una población bacteriana dada, los plásmidos presentan un número de copias definido (N). El valor de N es característico para cada huésped y bajo unas condiciones de crecimiento determinadas (Novick, 1987; Nordström, 1990). Los plásmidos poseen la capacidad de regular la frecuencia de iniciación de la replicación, mediada por sistemas de control negativo capaces de "sentir" y corregir fluctuaciones en el número de copias (Novick, 1987). Muchos plásmidos poseen además, mecanismos de partición que van asegurar que cada célula hija reciba como mínimo una copia de las moléculas plasmídicas después de la división celular. En una situación de equilibrio, el número de replications por copia

plasmídica es exactamente uno por generación celular. Si, por alguna razón, el número de copias es mayor que el valor del equilibrio, la frecuencia de replicación se ajustará a un valor menor que uno por copia plasmídica y generación celular. Por el contrario, si el número de copias se reduce, la frecuencia de replicación será mayor. El modelo de regulación del valor de N está basado en la inhibición (Pritchard *et al*, 1969) y se puede ajustar a dos tipos de funciones: i) una función hiperbólica, si la tasa de replicación es inversamente proporcional a la concentración de inhibidor; ii) una función constante, si pequeños cambios en la concentración del inhibidor causan una respuesta de todo o nada sobre la replicación (Nordström *et al*, 1984). El paso limitante de la regulación es la iniciación de la replicación. Los plásmidos ejercen su control negativo usando diferentes sistemas: RNAs antisense, proteínas represoras y repeticiones directas del DNA (iterones) que son sitio de unión para proteínas Rep. En los dos primeros casos, la regulación se realiza controlando la síntesis de proteínas Rep, limitantes de tasa, o la transición de un RNA precursor a "primer" de la iniciación de la replicación.

3.1. Control mediado por RNAs antisense

Por lo general, se trata de pequeños RNAs, de vida media corta, sintetizados a partir de un promotor constitutivo en dirección opuesta al RNA precursor del "primer" o al mRNA para la síntesis de la proteína Rep, recibiendo entonces, el nombre de RNAs contratranscritos (ctRNAs; Novick, 1987). Por medio de la formación de un RNA dúplex, pueden regular el procesamiento del RNA precursor (Itoh y Tomizawa, 1980) o la expresión de la proteína Rep limitante de tasa (Womble y Rownd, 1986). En este caso, también pueden realizar un bloqueo directo del sitio de unión de los ribosomas (Kim y Meyer, 1986; del Solar y Espinosa, 1992). Los casos mejor conocidos son los de los plásmidos ColE1 y pT181.

La iniciación de la replicación en ColE1 requiere la síntesis de un RNA "pre-primer" de 550 nt, el RNA II, por la RNA polimerasa y su posterior procesamiento por la RNasa H, cuando el duplex DNA-RNA II adopta una conformación adecuada. La regulación de la iniciación la lleva a cabo el RNA I, RNA antisense de 108 nt, complementario al extremo 5' del RNA II. La hibridación entre los dos RNAs altera la estructura secundaria del RNA II, con lo cual éste no hibrida con el DNA y no es

procesado por la RNasa H. La interacción inicial entre el RNA I y el RNA II se realiza en los lazos monocatenarios de las estructuras secundarias ("kissing complex"). Los complejos iniciales son inestables y reversibles. La interacción de la proteína Rom (o Rop), codificada por el plásmido, incrementa unas 100 veces la estabilidad del complejo (revisado por Eguchi *et al*, 1991).

En el caso de pT181, plásmido que replica por el mecanismo RC, la expresión de la proteína iniciadora RepC está controlada por dos pequeños ctRNAs que poseen el mismo extremo 5' y distinto extremo 3' (Novick *et al*, 1984). Estos RNAs son complementarios a la región líder del mRNA de *repC* (Kumar y Novick, 1985). La interacción entre ctRNAs y el mRNA *rep* se realiza a través de los lazos de las estructuras secundarias que pueden formar ambos RNAs. Esta interacción podría inducir la formación de una estructura semejante a la de un terminador transcripcional en un lugar del mRNA *rep* situado a 5' del inicio de la traducción de RepC (Novick *et al*, 1989). La generación de esta estructura conduciría a una terminación prematura de la síntesis del mRNA. Así, un mecanismo indirecto de terminación/atenuación regularía la expresión de la proteína de iniciación. La base de este modelo está en las distintas estructuras que podrían formar los elementos de secuencia I, II, III y IV del mRNA de *repC* (Fig. 1). Las secuencias I y II podrían aparearse entre sí, formando la estructura tallo-lazo implicada en la interacción con el ctRNA. Las secuencias III y IV son complementarias entre sí. A su vez, la secuencia I comparte 9 bases con la secuencia IV (que contiene la señal de iniciación de la traducción de *repC*) y por lo tanto, puede aparearse con el elemento III. En presencia de los ctRNAs, los elementos I y II formarían una estructura tallo-lazo que interaccionaría, a través del lazo, con la estructura secundaria del ctRNA. Los elementos III y IV se mantendrían apareados, formando una estructura tallo-lazo seguida en 3' por una secuencia AU₆, que funcionaría como un terminador transcripcional, causando la terminación prematura (atenuación) del mRNA *rep*. En ausencia de los ctRNAs, la interacción entre I y II se rompería al ir progresando la transcripción del mRNA *repC*, y se formaría una estructura más estable con la interacción de los elementos I y III, con lo cual el sitio de unión a los ribosomas (situado en el elemento IV) quedaría accesible para que se produzca la iniciación de la traducción de *repC*.

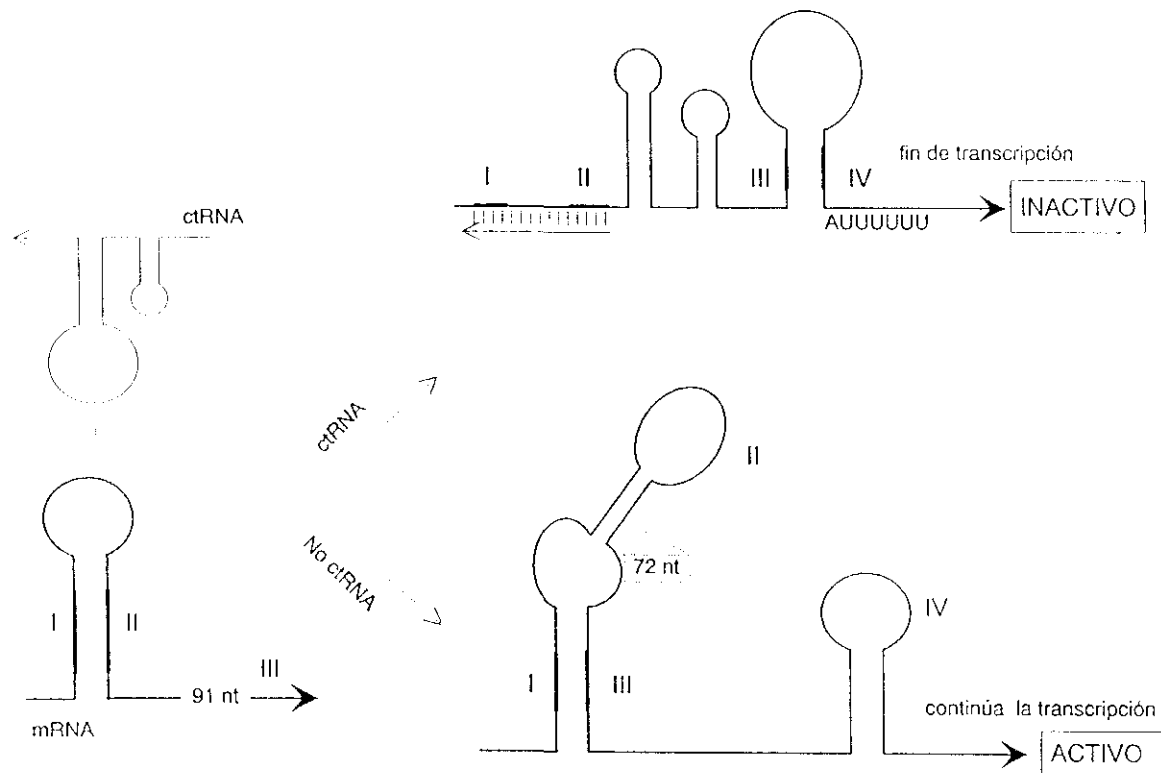


Figura 1. Control de la replicación de pT181 mediado por RNAs contratranscritos. Se muestra el mRNA *repC* (línea de trazo grueso) con los elementos I, II, III y IV (línea extragruesa) y el ctRNA (línea de trazo fino). En presencia del ctRNA, los elementos I y II formarían una estructura tallo-lazo que interaccionaría con la estructura secundaria del ctRNA. Los elementos III y IV se mantendrían apareados formando una estructura tallo-lazo seguida por la secuencia AU₆, la cual funcionaría como un terminador transcripcional del mRNA *repC*. En ausencia del ctRNA, los elementos I y III podrían interaccionar formando una estructura más estable, que evitaría la formación del terminador transcripcional.

3.2. Control mediado por proteínas represoras

Este mecanismo de control es poco frecuente, dado que la regulación ideal debe ser realizada por elementos de vida media corta (RNAs) que pueden responder ágilmente a fluctuaciones en el número de copias plasmídicas. El caso mejor conocido es el de λdv , cuya replicación está limitada bien por la utilización de la proteína O o bien por la activación transcripcional del origen de replicación (situado dentro del gen O). La proteína Cro (o Tof), producto del primer gen del operón O (que contiene los genes *cro/tof*, O y P) es el represor transcripcional de este operón, con lo cual se autorregula y puede modular la frecuencia de iniciación (Lee y Bailey, 1984a, 1984b).

3.3. Control mediado por iterones

Los plásmidos que contienen iterones regulan su replicación a través de la unión de las proteínas Rep a varias repeticiones directas, situadas en el origen de replicación y a veces, en otro lugar del replicón básico, fuera del origen. Muchas de las proteínas Rep de estos plásmidos se autorregulan o están bajo control transcripcional (Kittell y Helinski, 1992). Se han propuesto tres modelos para el control del número de copias de los plásmidos con iterones:

a) Los iterones titulan la proteína Rep, limitante de tasa, reduciendo su disponibilidad para el origen (Tsutsui *et al*, 1983). Este modelo no soluciona dos problemas: i) la mayoría de estas proteínas Rep son autorregulables, y una titulación implicaría una derrepresión; ii) un rápido incremento de la proteína RepA de P1 no conduce a un incremento del número de copias (Pal y Chatteraj, 1988).

b) Existen dos formas de la proteína Rep: una estaría implicada en autorregulación y la otra sería activa en iniciación (Trawick y Kline, 1985). Alternativamente, los iterones del origen tienen distinta afinidad por la proteína Rep que los iterones situados al inicio de la transcripción del gen *rep* (Chatteraj *et al*, 1985). Hasta el momento no hay una evidencia directa de la existencia de dos formas de la proteína Rep físicamente distintas o funcionalmente distinguibles (Kittell y Helinski, 1992).

c) Las proteínas Rep unidas a los iterones pueden interaccionar entre sí causando un impedimento estérico que bloquearía la iniciación de la replicación. Este fenómeno podría ocurrir en *cis* entre los iterones del *ori* y de la región de control, curvando el DNA ("looping"; Pal y Chatteraj, 1988) o puede ocurrir entre los iterones de varios orígenes en *trans* ("handcuffing"; McEachern *et al*, 1989; Kittell y Helinski, 1992).

3.4. Control mediado por RNAs antisense y proteínas

En algunos casos, la regulación de la replicación se realiza por la acción combinada de un represor transcripcional y un RNA antisense (del Solar *et al*, 1995b). Se ha estudiado con cierto detalle en los plásmidos R1 y pLS1.

El control de la replicación de R1 se realiza a nivel de la expresión de la proteína

RepA. La transcripción del gen *repA* está controlada por dos promotores: uno distal que es constitutivo y otro proximal que, en condiciones normales, está totalmente reprimido por la proteína CopB, cuyo gen está localizado entre ambos promotores. El control post-transcripcional está mediado por CopA, ctRNA complementario a la región líder del mRNA de *repA* o CopT. La interacción entre ambos RNAs impide la síntesis de un péptido líder, Tap, al cual está acoplada la traducción de RepA. La proteína CopB podría tener un papel accesorio en el control de la replicación, actuando en situaciones en las que el valor de N disminuya mucho respecto al normal o en el establecimiento inicial del plásmido (revisado por Nordström y Wagner, 1994; Wagner y Simons, 1994).

El plásmido pLS1 codifica dos elementos que actúan en *trans* y que regulan su número de copias: la proteína CopG y el RNA II (del Solar y Espinosa, 1992). A nivel transcripcional, la unión de la proteína CopG a su operador, situado en el promotor P_{cr} , reprime la síntesis del mRNA a partir del cual se transcriben los genes *copG* y *repB*. A nivel traduccional, el control de la replicación se realiza por inhibición directa tras el apareamiento del RNA II (ctRNA complementario a la región 5' del mRNA *cop-rep*) con el sitio de unión a los ribosomas de *repB* (Fig. 2). El modelo de control de replicación de pLS1 (del Solar y Espinosa, 1992) propone que cuando el plásmido coloniza un nuevo huésped, o cuando N está por debajo de un cierto valor ($N < 22$), el promotor P_{cr} no sería reprimido por CopG, con lo cual aumentaría la tasa de síntesis del mRNA *cop-rep* y se produciría un rápido incremento de N. Si el valor de N fuese mayor que el correspondiente al del estado de equilibrio ($N = 22$), se produciría una acción combinada entre la represión de CopG y el aumento en la dosis del RNA II ya que al ser sintetizado constitutivamente, su concentración sería proporcional a N. La proteína CopG mantendría los niveles de mRNA *cop-rep* dentro de ciertos límites y el RNA II corregiría las fluctuaciones en el valor de N. Evidencias recientes de nuestro laboratorio indican que el control de la replicación de pLS1 es realizado por el circuito de regulación entero: el represor transcripcional, CopG y el ctRNA, RNA II (del Solar *et al.*, 1995a).

Aunque el control primario de la replicación plasmídica se realiza a nivel de la iniciación de la síntesis de la cadena líder, podrían existir otros modos de acción a

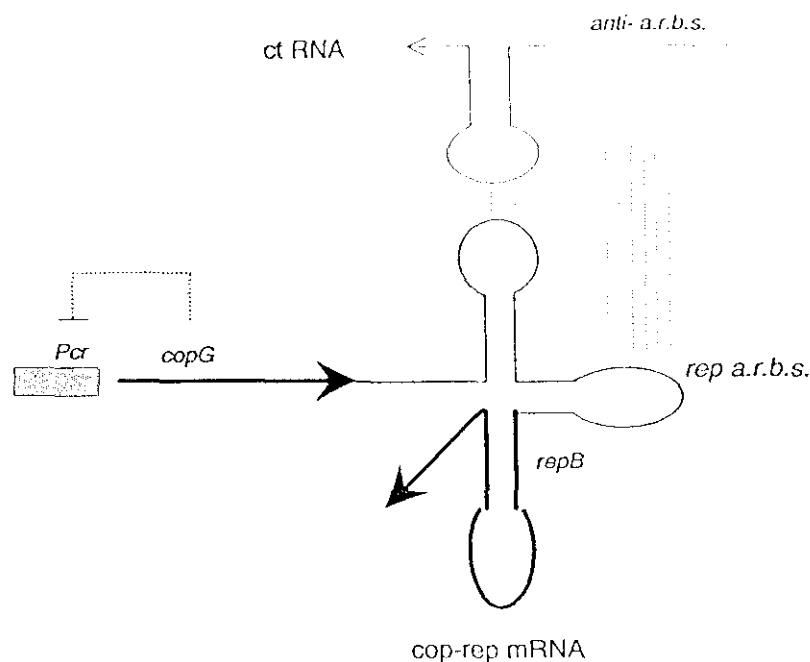


Figura 2. Control de la replicación de pLS1 mediado por un ctRNA y una proteína represora. A nivel transcripcional, la unión de la proteína CopG a su diana, situada en el promotor P_{cr} , reprime la síntesis del mRNA de los genes $copG$ y $repB$ (línea extra-gruesa). A nivel traduccional, el control de la replicación se realizaría por inhibición directa tras el apareamiento del ctRNA (línea fina) con el sitio atípico de unión a los ribosomas (a.r.b.s.) de $repB$.

nivel de la elongación o en la iniciación de la síntesis de la cadena retrasada en los plásmidos con replicación RC. Se ha observado que la tasa de elongación se ve afectada por cambios en la secuencia de DNA: la inserción de secuencias de terminación de 22 pb en plásmidos pUC ha tenido efectos sobre el valor de N (Hidaka *et al*, 1988). Del mismo modo, la eficiencia de iniciación en la conversión de ssDNA a dsDNA puede afectar a N (Gruss *et al*, 1987; del Solar *et al*, 1987b).

Existen otros factores secundarios que pueden modular la replicación, aunque no son elementos capaces de corregir fluctuaciones en el valor de N, por lo que no se consideran como verdaderos elementos reguladores. Algunos de éstos son:

a) Secuencias plasmídicas que actúan en *cis*, como son el locus *cmp* de pT181, que parece influir en la eficiencia de utilización de la proteína Rep (Gennaro y Novick,

1986), y los sitios GATC del origen de replicación de P1, que deben estar metilados para que se produzca la replicación (Abeles y Austin, 1987).

b) Factores codificados por el cromosoma del huésped: el locus *pcnB* de *Escherichia coli* reduce el valor de N de pBR322 (Lopilato *et al*, 1986). Por el contrario, mutaciones en el locus *recD* de *E.coli* incrementan el valor de N de ciertos plásmidos (Seelke *et al*, 1987).

c) Proteínas del huésped como son IHF (Stenzel *et al*, 1987) y DnaA de *E.coli* que está implicada en la iniciación de la replicación de muchos plásmidos.

d) Cambios en el superenrollamiento del DNA plasmídico, los cuales afectan la eficiencia de iniciación de la replicación (Minden y Marians, 1985). Asimismo, el aumento de la transcripción a través del origen en dirección opuesta a la de la replicación pueden reducir la eficiencia de ésta (Steuber y Bujard, 1982).

4. REPLICACIÓN TIPO CÍRCULO RODANTE

Este tipo de replicación fue descrito por primera vez para bacteriófagos de cadena sencilla (ϕ X174, M13, fd) por Gilbert y Dressler (1968). La proteína iniciadora de la replicación está codificada por el fago: proteína del gen A, GpA, en los fagos isométricos (ϕ X174, G4) y la proteína del gen II, gpII, para los fagos filamentosos (M13, f1, fd). La proteína iniciadora corta la hebra viral (VS) de la forma replicativa (RF) del DNA en un lugar específico, el origen de síntesis de la hebra viral. El corte del DNA, mediado por la proteína, genera un grupo 3'-OH libre que será extendido por la DNA polimerasa III. En el desenrollamiento del DNA de los fagos isométricos participan la proteína *rep*-helicasa de *E.coli* y la proteína GpA. Esta proteína queda unida covalentemente al extremo 5'-fosfato del sitio de corte, y separa la hebra viral parental como un círculo rodante que gira alrededor de la hebra complementaria mientras avanza la replicación. Al finalizar el ciclo de replicación, la proteína GpA corta el origen regenerado y se ligan los extremos 3' y 5' de la hebra viral parental, formando un círculo monocatenario que estará cubierto por SSB (proteína de unión

a ssDNA de *E.coli*). Este intermediario será posteriormente convertido en una molécula bicatenaria covalentemente cerrada: la forma replicativa RF. La proteína GpA se transfiere a la hebra viral nueva e inicia nuevas rondas de replicación.

En el caso de los fagos filamentosos se sigue un mecanismo similar, con la salvedad de que la proteína gpII no se une covalentemente al 5'-fosfato en el sitio de corte sino que forma un complejo más lábil con la hebra complementaria (Meyer y Geider, 1982). Para la conversión de la VS monocatenaria en RF bicatenaria, la RNA polimerasa en los fagos filamentosos o el primosoma en los fagos isométricos, sintetizan un RNA "primer" que será elongado por la DNA polimerasa III usando como molde la VS hasta alcanzar el extremo 5' del "primer". A continuación, se elimina el RNA "primer" gracias a la actividad exonucleasa 5'→ 3' de la DNA polimerasa I y se polimeriza el DNA restante hasta completar una molécula bicatenaria RF (Rasched y Oberer, 1986; Baas y Jansz, 1988).

La replicación tipo RC se describió posteriormente en un grupo de plásmidos de pequeño tamaño y alto número de copias aislados de bacterias gram(+), si bien se han descrito plásmidos de bacterias gram(-) con este mecanismo de replicación (Gielow *et al*, 1991; Gigliani *et al*, 1993; Kleanthous *et al*, 1991; Yasukawa *et al*, 1991). Se ha puesto de manifiesto que el mecanismo de replicación RC y la producción de ssDNA como intermediarios de replicación estimulan en gran medida la capacidad de recombinación intra- e interplasmídica, facilitando también su diseminación entre bacterias (Gruss y Ehrlich, 1989). Este supuesto, junto con la observación de la estructura genética de varios plásmidos de estafilococos, llevaron a la hipótesis de que los plásmidos con replicación RC estarían contruidos como cassettes de genes (Projan y Novick, 1988), que corresponderían a módulos genéticos intercambiables entre los distintos plásmidos. El grado de homología de los distintos módulos puede variar, pero en todos los casos, es significativamente alto. El único módulo esencial es el que lleva las funciones de replicación de la hebra líder. Se han definido algunos módulos principales (del Solar *et al*, 1993c): i) la región de control e iniciación de la hebra líder (LIC); ii) el determinante de resistencia a antibióticos (DET); iii) el origen de cadena sencilla (*sso*); iv) la región implicada en movilización conjugativa y recombinación (MOB/PRE) (Priebe y Lacks, 1989). Como ejemplos se pueden citar:

el alto grado de homología entre la región LIC de pMV158 (plásmido de *Streptococcus agalactiae*) y pE194 (plásmido de *Staphylococcus aureus*); a nivel de la región DET de pLS1 (*Streptococcus pneumoniae*) y de pT181 (*S.aureus*); o entre las regiones *sso* y MOB/PRE de pMV158 y pUB110 (*S.aureus*) (Fig. 3). Basándose en las homologías existentes a nivel de la secuencia de DNA y de la organización genética de la región LIC, se han definido cuatro familias de plásmidos que replican mediante el mecanismo de círculo rodante (Novick, 1989). Los representantes de cada una de las familias son: pT181; pUB110/pC194; pLS1/pE194 y pSN2.

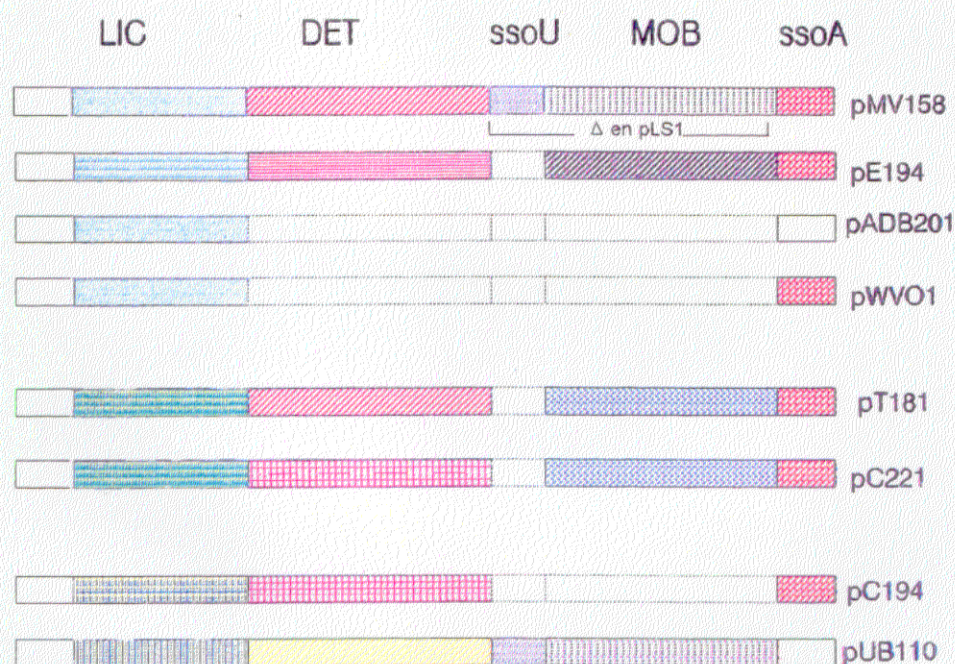


Figura 3. Representación de los plásmidos con replicación tipo RC como módulos de información genética. Los mapas funcionales muestran la presencia (líneas continuas) o ausencia (líneas discontinuas) de los casettes indicados: LIC, región de iniciación y control de la replicación; DET, resistencia a antibióticos; MOB/PRE, región implicada en recombinación y movilización plasmídica; *ssoA* y *ssoU*, orígenes de replicación de la cadena retrasada. Los casettes están rotulados y coloreados de acuerdo a las homologías existentes. Se indica la región de pMV158 deletada para construir el plásmido pLS1.

Para el mecanismo de replicación RC son necesarios tres elementos: el origen de doble cadena (*dso*), la proteína iniciadora de la replicación (*Rep*) y el origen de cadena retrasada (*sso*).

4.1. Origen de replicación de la cadena líder (*dso*)

El origen de la cadena líder o *dso* [también llamado *ori(+)*] se encuentra situado "corriente arriba" o dentro de la región codificante para la proteína Rep. Contiene las secuencias de DNA reconocidas específicamente por la proteína Rep para que se produzca la iniciación y la terminación de la síntesis de la cadena líder. La mayoría de los orígenes, quizás con la excepción de pUB110, poseen secuencias con potenciales estructuras tallo-lazo (Gruss y Ehrlich, 1989). El *dso* de los miembros de la familia de pT181 se puede dividir funcionalmente en dos regiones (Fig. 4). Una de ellas, con capacidad de generar una estructura tallo-lazo (IR-II), contiene el sitio de

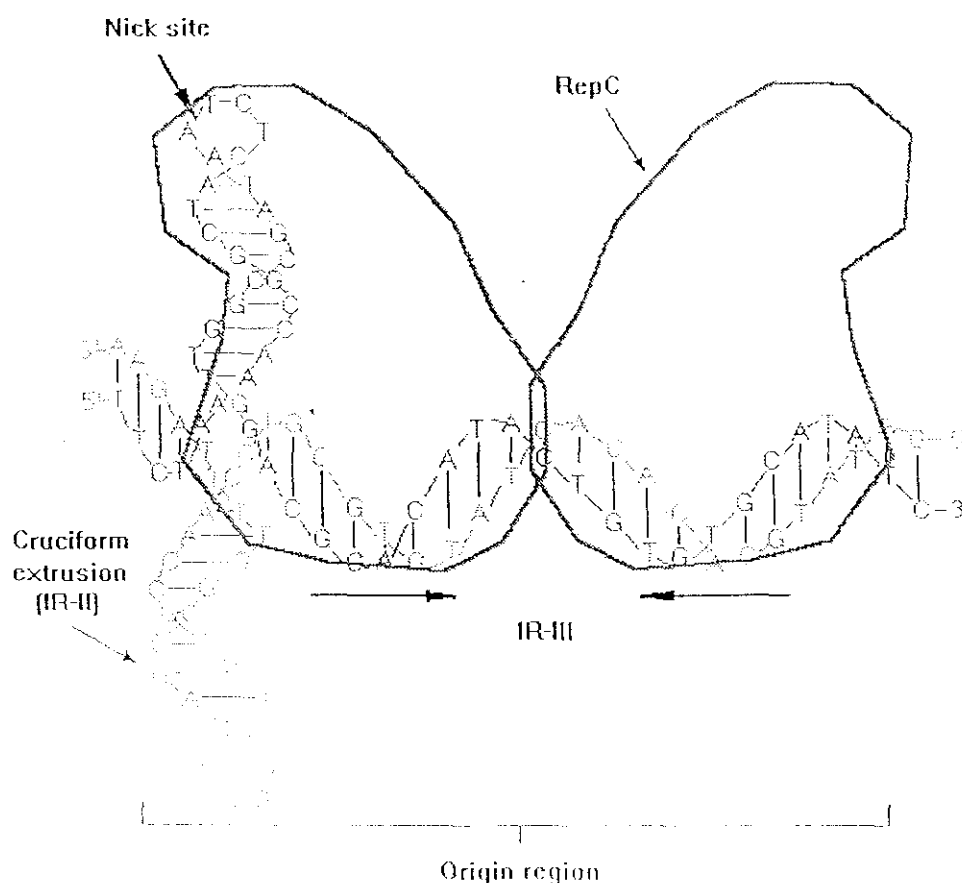


Figura 4. Modelo de interacción RepC-*dso* para pT181. Se muestra la unión simétrica del dímero de RepC a la repetición invertida IR-III, que se indica con flechas. Se muestra como una subunidad de RepC se une de modo asimétrico a la estructura cruciforme IR-II que contiene el sitio de corte indicado ("nick site"). Las letras oscuras representan los nucleótidos que corresponden a la hebra líder de pT181, y las letras claras representan los nucleótidos correspondientes a la cadena retrasada. (Figura tomada de Wang *et al.*, 1993).

corte y se conserva entre los plásmidos de la familia. La otra región es adyacente en 3' a la anterior, contiene el sitio de reconocimiento de la proteína Rep, y es específica para cada plásmido (Koepsel *et al*, 1986). El *dso* de pT181 contiene tres pares de repeticiones invertidas (IR-I, -II y -III) capaces de formar estructuras del tipo tallo-lazo (Gennaro *et al*, 1989). El par central, IR-II, contiene el sitio de corte para la iniciación y puede formar una estructura cruciforme *in vivo* e *in vitro*, promovida o estabilizada tras la unión de la proteína RepC (Noirot *et al*, 1990). El elemento IR-III no está conservado entre los miembros de la familia y constituye el determinante de especificidad en el reconocimiento del origen. Para el reconocimiento de la proteína RepC sólo se requieren los primeros 11 nucleótidos del elemento IR-III, que comprenden el brazo proximal y la región central de la estructura diada (Fig. 4; Wang *et al*, 1993). Por el momento, el papel de IR-I es desconocido.

4.2. Proteínas de replicación (Rep)

Las proteínas Rep, codificadas por los plásmidos, son las encargadas de la iniciación de la replicación, ya que al reconocer una secuencia específica del *dso* producen una rotura en una de las hebras del DNA, generando el extremo 3'-OH que será usado como "primer", quizás por la DNA polimerasa III, para la síntesis de la cadena líder. La proteína GpA de ϕ X174, así como las proteínas Rep de los plásmidos pT181 y pC221 permanecen unidas covalentemente al extremo 5'-fosfato generado tras la reacción de corte (Langeveld *et al*, 1978; Thomas *et al*, 1990). Sin embargo, hasta el momento no ha sido demostrada la existencia de un enlace covalente para la proteína gpII del fago f1 y fagos filamentosos relacionados (Meyer y Geider, 1979). Las proteínas Rep actúan en *trans*, poseen actividades de endonucleasa específica y de polinucleotidil-transferasa, y son esenciales para la replicación del plásmido. Por lo general, su síntesis constituye la etapa limitante del proceso replicativo. Las proteínas Rep de los plásmidos de la familia de pT181 poseen un 75-85% de identidad en la secuencia de aa. Sin embargo, presentan dos regiones con un alto grado de divergencia: la región N-terminal de la secuencia codificante, que corresponde al *dso* y una región localizada en el extremo C-terminal, que comprende un segmento de 6 aa y constituye el determinante de especificidad de la proteína (Projan y Novick, 1988; Dempsey *et al*, 1992; Wang *et al*, 1992). Entre las dos regiones divergentes, se encuentra una región central altamente conservada que contiene la Tyr

implicada en la unión covalente al DNA durante la iniciación de la replicación (Thomas *et al*, 1990). Además de participar en la iniciación, las proteínas Rep participan en la terminación de la replicación, como se ha demostrado para ϕ X174 (van der Ende *et al*, 1982), fd (Meyer *et al*, 1981) y pT181 (Murray *et al*, 1989). Recientemente, se ha propuesto un modelo para la terminación de la replicación en pT181 (Rasooly y Novick, 1993), en el cual la subunidad intacta del homodímero de RepC produce un nuevo corte en la cadena nueva sintetizada (tras alcanzar el *dso* reconstituido y proseguir unos nucleótidos más) y por medio de un intercambio de hebras se libera una molécula dsDNA completa, un intermediario de ssDNA circular y un heterodímero de RepC compuesto por una molécula intacta y otra unida a un pequeño oligonucleótido (Rasooly *et al*, 1994a).

Por otra parte, y en base a datos genéticos, se ha propuesto (Noirot-Gross *et al*, 1994) que la proteína iniciadora de la replicación de pC194, RepA, podría poseer dos centros catalíticos no equivalentes que romperían enlaces fosfodiéster por dos mecanismos diferentes, transesterificación e hidrólisis. Predicciones de ordenador muestran que las proteínas Rep de la familia de pC194 poseen cinco regiones conservadas. La región IV muestra homología con el centro activo de la proteína GpA de ϕ X174, y dos de los aa conservados del sitio activo de la proteína RepA de pC194 (Tyr214 y Glu210) se encontrarían localizados en una región de α -hélice de la proteína. Sin embargo, hasta el momento las únicas proteínas Rep de la familia de pC194 que han sido purificadas son la proteína RepK de pKYM (Ozaki *et al*, 1994) y más recientemente la proteína RepU de pUB110 (Müller *et al*, 1995). Parece ser que la proteína RepK se une específicamente como monómero al *dso* de pKYM y que, a diferencia de lo que ocurre con la proteína RepC de pT181 (Wang *et al*, 1992), RepK no induce una curvatura del DNA tras su unión a la región del origen (Ozaki *et al*, 1994). Desafortunadamente, la proteína RepK purificada perdió la capacidad para introducir un corte monocatenario en el sitio de iniciación de la replicación del DNA (actividad de corte) tras usar para su purificación una columna de heparina-sefaraosa (Ozaki *et al*, 1994).

Ilyina y Koonin (1992) han identificado motivos conservados entre las proteínas Rep y las proteínas Mob, éstas últimas relacionadas con la transferencia conjugativa

de DNA plasmídico. El motivo 1 (cuya secuencia consenso es: FUtltXXX o FUuypXXX, donde U representa un residuo hidrofóbico y X, cualquier residuo) está presente sólo en la región N-terminal de las proteínas Rep y no se le ha asignado función alguna. El motivo 2 (XpHUhUUX o XuHUhUUX), contiene dos His conservadas en un entorno hidrofóbico y, por analogías con metaloenzimas, podría estar implicado en la coordinación de iones metálicos requeridos para la actividad de estas proteínas. Finalmente, el motivo 3 (UXXYUXkXXX o UXXYUXhXXX), está localizado en la región C-terminal de las proteínas Rep y en el extremo N-terminal de las proteínas Mob, que contendría el residuo Tyr conservado, implicado en la unión covalente al DNA. Como se dijo anteriormente, las proteínas Rep no presentan motivos típicos de unión a DNA, aunque se ha postulado un motivo LZ en la proteína RepB de pLS1 (de la Campa *et al*, 1990). Para los plásmidos pT181 y pC221 se ha demostrado la existencia del determinante de especificidad en 6 aa de la región C-terminal de sus proteínas (Wang *et al*, 1992), localizándose el residuo Tyr activo en la región central (Thomas *et al*, 1988). Parece que la región C-terminal de la proteína gpII del fago f1, podría estar implicada en la regulación de la replicación, ya que se ha comprobado que la proteína del gen X, sintetizada a partir de un codón de iniciación interno del gen II (idéntica a un tercio del C-terminal de gpII), es un potente inhibidor de la síntesis *in vivo* del DNA del fago (Fulford y Model, 1988).

4.3. Origen de replicación de la cadena retrasada (*sso*)

El origen de cadena sencilla [*sso* u *ori*(-)] contiene el sitio de iniciación para la síntesis de la cadena retrasada. El *sso* se encuentra situado en la misma hebra que el *dso*, aunque separado físicamente de él. Se localiza dentro de una región no-codificante altamente estructurada y su actividad es dependiente de orientación (Gruss *et al*, 1987; del Solar *et al*, 1987b, 1993a; Novick, 1989). Basándose en homologías a nivel de DNA, se han descrito dos tipos principales de *sso*: *ssoA* representado por los plásmidos pT181 (Gruss *et al*, 1987) y pLS1 (del Solar *et al*, 1987b); y *ssoU* de pUB110 y pMV158 (van der Lelie *et al*, 1989). Muchos *sso* son específicos de huésped y en algunos casos como en *S.aureus* (Gruss *et al*, 1987), *S.pneumoniae* (del Solar *et al*, 1987b; Kramer *et al*, 1995) y *Streptomyces lividans* (Deng *et al*, 1988), la delección del *sso* causa acumulación de ssDNA, disminución del número de copias y/o inestabilidad segregacional plasmídica.

4.4. Modelo de replicación por círculo rodante

El modelo actual para explicar el mecanismo de replicación tipo RC (Fig. 5) está basado principalmente en los plásmidos, pT181, pC221 y pLS1 (Rasooly y Novick, 1993; Rasooly *et al*, 1994a, 1994b; Dempsey *et al*, 1995; del Solar *et al*, 1987b, 1993c). Se pueden distinguir tres etapas principales: iniciación y elongación de la síntesis de la cadena líder; terminación de la replicación de la cadena líder, y replicación de la cadena retrasada (conversión de ssDNA en dsDNA).

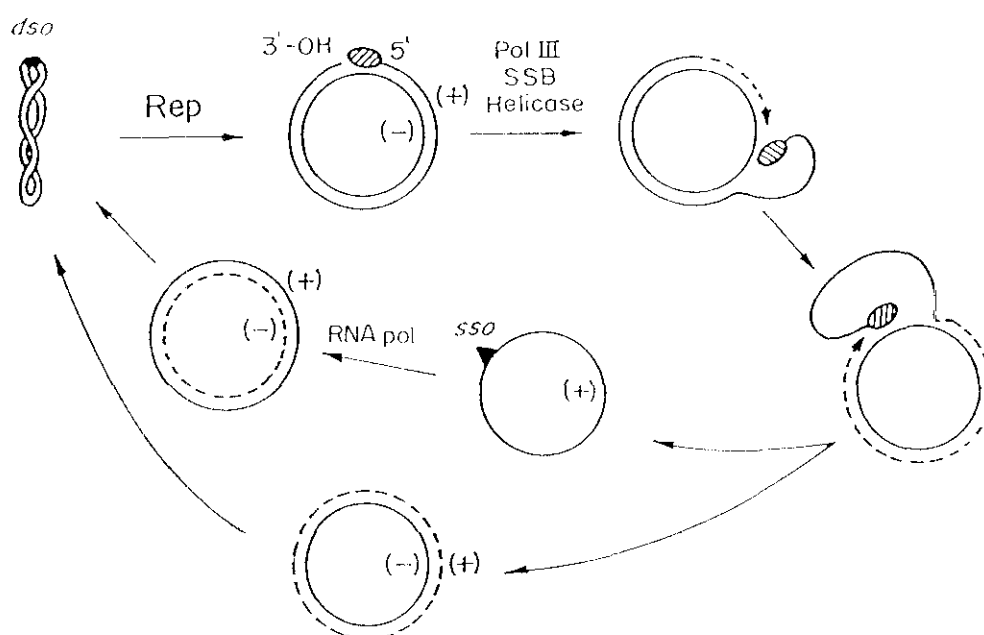


Figura 5. Modelo de replicación por el mecanismo de círculo rodante. La proteína Rep (●) reconoce DNA superenrollado, introduciendo una rotura específica dentro del origen de replicación de la cadena (+) (*dso*). El extremo 3'-OH generado, será usado como "primer" para la síntesis de la cadena líder nueva (línea discontinua). La proteína Rep permanece unida covalentemente al extremo 5'-P de la cadena parental(+), mientras ésta va siendo desplazada. Cuando la horquilla de replicación alcanza el *dso* reconstituido, termina la síntesis de la cadena líder y se produce la circularización y liberación de la cadena parental(+) desplazada como intermediario de ssDNA. La conversión de ssDNA a dsDNA se produce tras el reconocimiento del *sso* (▲) por la RNA polimerasa del huésped para la iniciación de la cadena(-).

Iniciación y elongación de la cadena líder

La unión asimétrica del homodímero de RepC (Fig. 4) de pT181 al sitio de reconocimiento del *dso* induce la formación de una curvatura en el DNA entre los elementos IR-II e IR-III (Koepsel y Khan, 1986), e incrementa la extrusión de la

estructura tallo-lazo de IR-II, que contiene la secuencia específica de corte (Noirot *et al*, 1990; Wang *et al*, 1993). Una de las subunidades de RepC introduce un corte específico de sitio en la cadena(+) y queda unida covalentemente al extremo 5' del sitio de corte mediante un enlace tirosil-fosfodiéster (Thomas *et al*, 1990). La reacción de corte genera el extremo 3'-OH que sería usado por la DNA polimerasa III para sintetizar una nueva cadena(+) usando como molde la cadena(-) del plásmido. Al mismo tiempo, la cadena(+) parental se iría desplazando mediante la acción de una helicasa del huésped, mientras que la proteína SSB cubriría la hebra parental desplazada como ssDNA. La replicación continúa hasta reconstituir el *dso* y se extiende unos 12 nucleótidos más allá.

Terminación de la replicación de la cadena líder

Como la replicación de la hebra líder se extiende unos nucleótidos más allá del *dso* reconstituido, la subunidad de RepC intacta iniciaría una reacción de transferencia de hebra mediante introducción de un corte en el nuevo *dso* sintetizado y unión a los 12 nt extra. El modelo actual de terminación (Rasooly y Novick, 1993) postula que el grupo 3'-OH que se ha generado ataca al *dso* parental, produciendo un nuevo 3'-OH que atacará el enlace entre la subunidad de RepC que inició la replicación y el DNA parental (Fig. 6). Al final, se obtendrían como productos de replicación una molécula dsDNA reconstituida, un intermediario de ssDNA y un heterodímero de RepC [constituido por dos subunidades de RepC, una de las cuales (RepC*) lleva unida covalentemente un corto oligonucleótido], que es inactivo en replicación. Los autores han demostrado que este mecanismo de inactivación de la proteína Rep se produce en otros miembros de la familia de pT181 tanto en *B.subtilis* como en *S.aureus* (Rasooly *et al*, 1994a). Recientemente, Müller *et al* (1995) han sugerido que la proteína RepU de pUB110 podría ser convertida durante la replicación en un hetero-oligómero inactivo RepU-RepU*, limitando con ello la cantidad de proteína RepU útil para iniciación de la replicación, del mismo modo que ocurre para pT181.

Como ya se ha indicado, el sitio activo de la proteína RepA de pC194 podría estar compuesto por dos centros catalíticos que actúan sobre los enlaces fosfodiéster mediante dos mecanismos distintos: transesterificación, como en las topoisomerasas e hidrólisis, como se ha descrito para algunas exo- y endonucleasas. Basándose en el

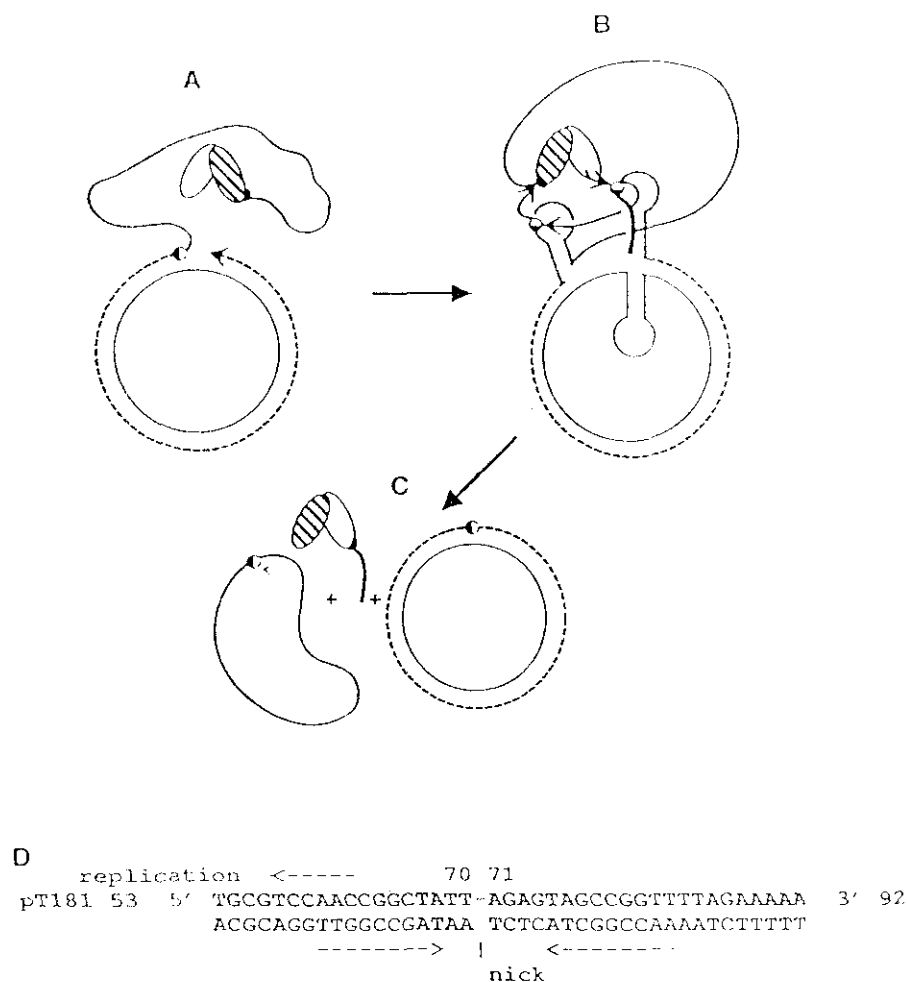


Figura 6. Modelo de terminación de la replicación del plásmido pT181. **A.** Diagrama de la configuración esperada de una molécula de DNA plasmídica hacia el final de un ciclo de replicación. Una subunidad (sombreada) del dímero de RepC está unida covalentemente al extremo 5' de la hebra desplazada y el punto de crecimiento de la hebra naciente (flecha) está próximo al sitio de corte del *dso* (●). **B.** El sitio de corte ha sido replicado, la cadena líder se extiende unos nt más allá y la horquilla del origen se ha formado en las cadenas líder nueva y desplazada, así como en la cadena retrasada. La segunda subunidad de RepC (no sombreada) inicia una reacción concertada de transferencia de hebra (flecha) cortando el origen recién sintetizado y quedando unida a un corto oligonucleótido que contiene aproximadamente 12 nt de la mitad 3' de la horquilla del *dso*. El grupo 3'-OH generado ataca el *dso* parental, y el 3'-OH desplazado ataca después el enlace viejo RepC-DNA, desplazando a la proteína y restaurando la continuidad de la hebra(+) desplazada, que es liberada como un círculo monocatenario. **C.** Los productos finales son: un monómero circular monocatenario que representa la cadena líder desplazada, un heterodímero de RepC con el oligonucleótido unido a una subunidad, y un monómero plasmídico bicatenario que contiene la cadena líder nueva. El monómero monocatenario replica después por un mecanismo independiente, que no implica RepC, para completar el ciclo. **D.** Se muestra la secuencia del *dso* alrededor del sitio de corte ("nick"). Las flechas discontinuas convergentes indican el tallo de la horquilla del *dso*. (Figura tomada de Rasooly y Novick, 1993).

análisis de mutantes en los residuos conservados de la proteína RepA de pC194, los autores (Noirot-Gross *et al*, 1994) especulan sobre un mecanismo de terminación distinto al de pT181, aunque no descartan una posible inactivación de la proteína RepA similar a la que se produce en RepC durante la replicación. La replicación se iniciaría a través del mecanismo de transesterificación, característico de las topoisomerasas, produciéndose el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de Tyr214 sobre el enlace fosfodiéster del DNA, quedando la proteína covalentemente unida al DNA. El residuo Glu142 podría facilitar el ataque uniendo un ión metálico (Mg^{2+}) que ayudaría a neutralizar las cargas negativas del sustrato fosfodiéster, como se ha descrito para la actividad exonucleasa 3'→5' de la DNA polimerasa I de *E.coli* (Beese y Steitz, 1991). Tras una ronda de replicación, el residuo Glu210 activaría una molécula de agua para que se produzca el ataque nucleofílico sobre el enlace fosfodiéster de la nueva hebra sintetizada, o promovería indirectamente la activación de la molécula de agua a través de la quelación de un ión metálico. Una nueva reacción de transesterificación generaría una molécula de ssDNA y rompería la unión de la proteína al extremo 5' del DNA.

Replicación de la cadena retrasada

La iniciación de la replicación de la cadena retrasada se produce tras el reconocimiento del *sso* por proteínas del huésped e implica la conversión de ssDNA en dsDNA (Fig. 5). Para los plásmidos que poseen *ssoA*, se ha demostrado que la replicación de la cadena retrasada no requiere funciones codificadas por el plásmido (Birch y Khan, 1992), pero sí se necesita el reconocimiento del *sso* (*ssoA* o *ssoU*) por la RNA polimerasa del huésped (Dempsey *et al*, 1995; Kramer *et al*, 1995). Se postula que la molécula ssDNA estaría cubierta por la proteína SSB, excepto en la región del *sso* que, al ser altamente estructurada, actuaría como señal para su reconocimiento por la RNA polimerasa. Este enzima sintetizaría un "primer" que sería elongado, posiblemente por la DNA polimerasa III, hasta alcanzar el extremo 5' del RNA "primer". La DNA polimerasa I gracias a su actividad exonucleasa 5'→3' escinde el RNA "primer" y polimeriza el DNA restante, cuyos extremos serán ligados por la DNA ligasa (Geider y Kornberg, 1974; Díaz *et al*, 1994).

Recientemente, se ha determinado *in vitro* el sitio de iniciación de la cadena retrasada para los plásmidos pT181, pE194, pSN2 y pUB110/pC194 (Dempsey *et al*, 1995). Para pT181 y pSN2 se han encontrado múltiples sitios de iniciación dentro, o cerca, del lazo central conservado de la estructura secundaria del *ssb*. Esta iniciación múltiple correspondería a un RNA "primer" de tamaño fijo, sintetizado en distintas posiciones, o a RNAs "primer" de distinta longitud sintetizados a partir del mismo punto. El punto de iniciación mayor para pE194 se localizó en la secuencia consenso 5'-TAGCGa-3' del lazo central de la estructura del *ssb*. Para pUB110, la iniciación se produce a partir de un único sitio, que ya había sido definido *in vivo* (Boe *et al*, 1989).

5. FAMILIA DE pLS1

El plásmido pLS1 (4408 pb) se construyó mediante delección del fragmento *EcoRI* B (1122 pb) (Stassi *et al*, 1981) de su plásmido parental, pMV158 (5536 pb), aislado de una estirpe de *S.agalactiae* (Burdett, 1980). Una de las características más relevantes de pLS1, es su amplio espectro de huésped, que viene determinado por la capacidad de pLS1 de replicar en bacterias gram(+) como *S.pneumoniae* y *B.subtilis* (Espínosa *et al*, 1982; Lacks *et al*, 1986), y en bacterias gram(-) como *E.coli* (Lacks *et al*, 1986). Se conoce la secuencia de DNA completa para ambos plásmidos (Lacks *et al*, 1986; van der Lelie *et al*, 1989; Priebe y Lacks, 1989). pLS1 es el prototipo de una familia de plásmidos que replican mediante el mecanismo de RC. Desde la iniciación del trabajo experimental que engloba esta Tesis hasta este momento, se han caracterizado once miembros en esta familia, que incluye una gran variedad de huéspedes tanto bacterias gram(+) como gram(-): *S.agalactiae* (pMV158); *Lactococcus lactis* (pWVO1, pFX2); *S.aureus* (pE194); *Lactobacillus plantarum* (pLB4, pA1); *Lactobacillus curvatus* (pLC2); *Helicobacter pylori* (pHPK255); *Mycoplasma mycoides* (pADB201, pKMK1) y *Leuconostoc lactis* (pCI411). Los autores que han llevado a cabo el aislamiento y caracterización de estos plásmidos se indican en la Tabla 1. El establecimiento de esta familia se ha realizado tomando como base las homologías existentes a nivel de la proteína iniciadora y el *dso* (del Solar *et al*, 1993c).

Tabla 1. Miembros de la familia de pLS1.

Plásmido	Huésped	Aislado en	Tamaño(pb)	Autores ^a
pMV158	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Estados Unidos	5536	Burdett (1980); Lacks <i>et al</i> (1986); Priebe y Lacks (1989)
pWV01	<i>Lactococcus lactis</i>	Países Bajos	2177	Leenthous <i>et al</i> (1991)
pFX2	<i>Lactococcus lactis</i>	Nueva Zelanda	3536 ^b	Xu <i>et al</i> (1991)
pE194	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rumanía	3728	Horinouchi y Weisblum(1982a); Villafane <i>et al</i> (1987)
pLB4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Reino Unido	3548	Bates y Gilbert (1989)
pA1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Yugoslavia	2820	Vujcic y Topisirovic (1993)
pLC2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Alemania	2489	Klein <i>et al</i> (1993)
pHPK255	<i>Helicobacter pylori</i>	Reino Unido	1455	Kleanthous <i>et al</i> (1991)
pADB201	<i>Mycoplasma pylori</i>	Australia	1717	Bergemann <i>et al</i> (1989)
pKMK1	<i>Mycoplasma pylori</i>	Estados Unidos	1875	King y Dybvig (1992)
pCI411	<i>Leuconostoc lactis</i>	Irlanda	2926	Coffey <i>et al</i> (1994)

(a) Los autores citados son los que han publicado (o corregido) la secuencia de nucleótidos del plásmido

(b) El tamaño de pFX2 (un derivado de pFX1) debería ser 2508, si no se considera el gen *cat* de pC194, introducido por los autores

Algunas de las características que definen a esta familia son: *dso* localizado "corriente arriba" del gen *rep*; presencia de secuencias directamente repetidas (iterones) en el *dso*; existencia de dos elementos de control del número de copias: un ctRNA y una proteína (Cop), que actúa como represor transcripcional, y transcripción de los genes *cop* y *rep* a partir de un único promotor. Casi todos los miembros de esta familia presentan la secuencia consenso 5'-TACTACGA-3', en una región desapareada de una estructura potencial de tipo tallo-lazo presente en el origen de replicación. Las proteínas Rep presentan motivos conservados (Ilyina y Koonin, 1992) en sus regiones N-terminal y central, y una mayor divergencia en la región C-terminal, que podría estar implicada en el reconocimiento y especificidad de unión a DNA como ocurre

en la familia de pT181 (Novick, 1989). La región de control de la replicación presenta analogías a nivel estructural entre los miembros de esta familia: poseen proteínas Cop pequeñas (45-55 aa) que contienen un motivo HTH, típico de proteínas que se unen a DNA, y su operador se encuentra cerca o dentro del promotor a partir del cual se transcriben *cop* y *rep*. Codifican pequeños ctRNAs que solapan con la señal de iniciación de la traducción del gen *rep*.

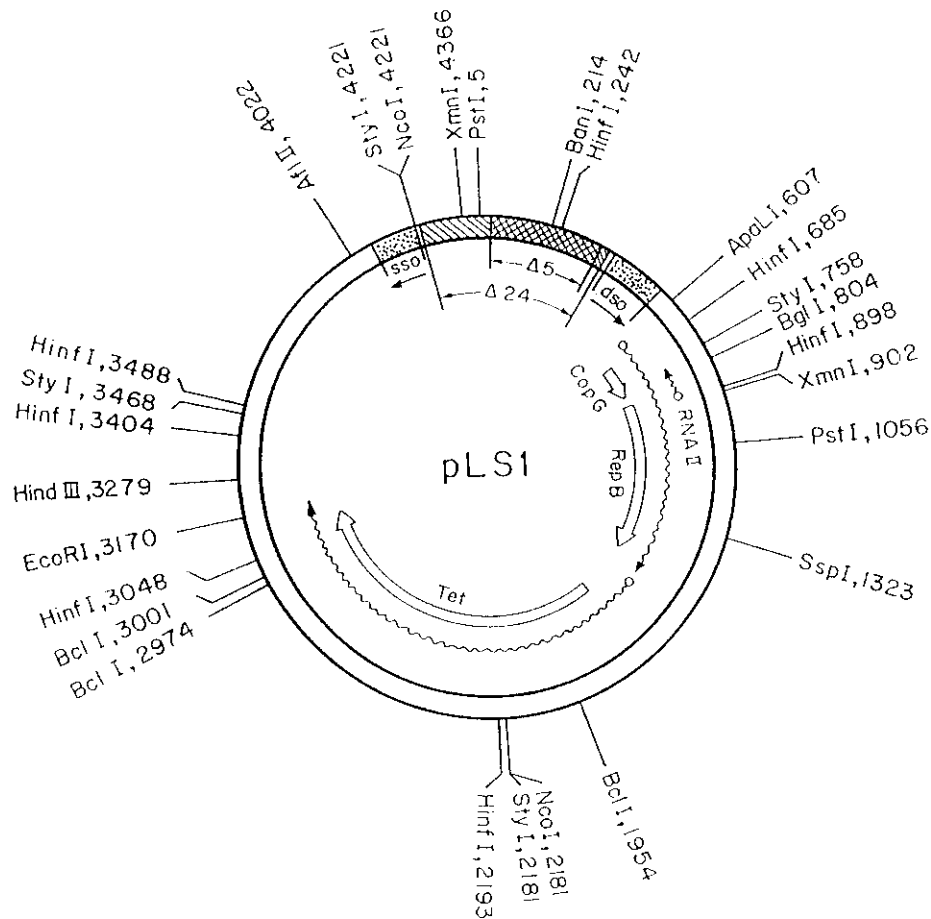


Figura 7. Mapa físico y funcional de pLS1. La región intergénica del plásmido (sombreada) incluye los orígenes *dso* y *ssoA*. Se indican la dirección de la replicación (flechas) de las cadenas líder (*dso*) y retrasada (*sso*), la extensión de las deleciones en pLS5 ($\Delta 5$) y pLS1 $\Delta 24cop7$ ($\Delta 24$), los promotores (círculos pequeños), RNAs (flechas onduladas) y los productos génicos (flechas anchas). Se muestran algunos sitios de restricción y las coordenadas de corte.

Tras el estudio de la organización genética del plásmido pMV158, se han identificado varios genes que constituyen diferentes módulos o cassettes, característicos de este tipo de plásmidos: la región de control e iniciación de la cadena líder (LIC) presenta los genes *repB*, *copG* y *malI*. Existe un determinante de resistencia a Tc (*tet*), y contiene el gen *mob* que está implicado en movilización conjugativa. Curiosamente, pMV158 posee dos regiones *sso* (*ssoA* y *ssoU*). El plásmido pLS1 carece de los módulos correspondientes al gen *mob* y a la región *ssoU*. pLS1 (Fig. 7) replica mediante el mecanismo tipo RC (del Solar *et al*, 1987b). Trabajos previos del laboratorio habían demostrado que la proteína iniciadora de la replicación, RepB, posee actividad topoisomerasa tipo I-5' (ver clasificación de topoisomerasas en Roca, 1995) e introduce un corte específico de sitio en la región *dso* (de la Campa *et al*, 1990). Se postuló que, tras el corte, se generaría un extremo 3'-OH que se usaría como "primer" para la síntesis de la cadena líder. Como productos de replicación se han observado moléculas de dsDNA e intermediarios de ssDNA (del Solar *et al*, 1987a, 1987b). Dentro del *dso*, se han descrito dos estructuras de tipo tallo-lazo, las Horquillas I y II, y tres repeticiones directas de 11 pb (Puyet *et al*, 1988), a las cuales la proteína RepB se une *in vitro* sobre DNA lineal (de la Campa *et al*, 1990). En el lazo de la Horquilla I se encuentra la secuencia consenso 5'-TACTACGA-3'. RepB reconoce esta secuencia y produce un corte específico entre los nt 448 (G) y 449 (A) (de la Campa *et al*, 1990). En la Figura 8 se muestra la secuencia de nucleótidos de la región LIC de pLS1, con la información relevante para el presente trabajo.

1 CT'GCAGAAGTAGTCGCTGA)'TGGCTAATTTCAGCGTATCAAAGACAAAGGCGACCAAAAATAGCTTGAGTTTC
 TTTTAGAACAAAAAGAAAGACAGTAGTTGCACCTACTGTCTTTTCTTTTGGGTGTGTGCTTTTAGTTCTCTCG
 AAC'TTTAGCGTCAAGCAIATTATATCATGGGGCGAGAAATTCGTCAAAATAATGCTATAATGCTTTTGA
 GGCACCTCAGCGATACGGTTCGGTGGTGTGAATCTCATTTACGTAGGGCGACTGGAAACGGATAGCTCAAAAG
 GGC GCGTTTGAGTGTTCGGGTGTGGGACTGCCTTCAGCTTCGGGCTGTAAAGACCCCTGATACTTTTGAATG
 AGATGACCCTTTGGGGTCTTTTGTGTTTTTTAGGGAGATGTTGTGGGGATTTTTCTCCGAAAAATCT
 AAAATATGGGGGGCTACTACGACCCCCCTATAGTGCAGGAGTGCCAAAATCAAAAAAAAACGCCTTAG
 CCTTAGAGCTGCAAGGGTTTGAGGCTCGTCAAATCTCGGCGACTTTTCGGCGACTTTTTCGGCGACTTTTFA
 GAGATTTTTTGGGAAAAATACGAAAAAGAATTGCAIITGAGTGCACGGTTATGCTACTATAGTTTTATAAAAT
 TTTGAGAGGTGACGCATGAAAAAAGATTGACGATAACATTAAGTGAATCGGTACTTGAAAAATCTTGAAAA
 M K K R L T I T L S E S V L E N L E K
 AATGGCAAGAGAGATGGGGTTATCAAAATCTGCAATGATTCTGTTGCCTTGGAAAAATTACAAGAAAGGTC
 M A R E M G L S K S A M I S V A L E N Y K K G Q
 AAGAAAAATAAAAAAGCCGTGCTGGCAGGCACTGGCTAAAGTCAAACATTTCTTGGGTATATTATACCTTT
 E K . K K P C W Q A L A K V K H F L G I L Y F
 Rep B ~~~~~ -35
 ATGGCTAAAGAAAGACAAAGATACTTCACTTTTTTACTTTATCTCTGAATCAATCCAAGCGACTGGGAGCT
 M A K E K A R Y F T F L L Y P E S I P S D W E L
 GAAACTTGAAACGCTTGGAGTGCAGATGGCAATTAGTCCATTGCATGATAAGGATAAGAGTAGTATCAAAG
 K L E T L G V P M A I S P L H D K D K S S I K G
 GACAAAAATATAAGAAAGCTCATTATCATGTGCTTTATATAGCTAAAAATCCAGTFACTGCAGATAGTGTA
 Q K Y K K A H Y H V L Y I A K N P V T A D S V
 CGTAAAAAGATTAAATTATGCTTGGTGAAAAAGTCTTGCAATGGTGCAGGTTGTTCTCAATGTGCAAAA
 R K K I K L L L G E K S L A M V Q V V L N V E N
 TATGTATTGTATTTAACGCACGAGAGCAAGGACGCTATTGCTAAGAAGAAACATGTTTATGATAAGGCTG
 M Y L Y L T H E S K D A I A K K K H V Y D K A D
 ATATAAGCTAATCAATAATTTTGATATTGACCGTTATGTGACGTTAGATGTCGAGGAAAAAGACCGAACTT
 I K L I N N F D I D R Y V T L D V E E K T E L
 TTCAATGTGGTTGTATCGCTTATTCGTGCGTACACTCTCCAAAATATTTTTGATTGTATGATTTTCATTGA
 F N V V V S L I R A Y T L Q N I F D L Y D F I D
 CGAAAAATGGAGAAACTTATGGGTTGACTATAAATTTGGTTAACAAGTTATTGCAGGAAAAACTGGTTTTTA
 E N G E T Y G L T I N L V N E V I A G K T G F M
 TGAAAT'TGTTGTTTGACGGAGCTTATCAACGTAGTAAGCGTGAACAAAGAACGAAGAGAGATAAAAAAGTT
 K L L F D G A Y Q R S K R G T K N E E R .
 GATCTTTGTGAAAACTACAGAAAGTAAAGAATGAAAAGAGTAATGCTAACATAGCATTACGGATTTTATGA
 CCGATGATGAAGAAAAGA¹⁵⁸⁰

Figura 8. Secuencia de nucleótidos desde la coordenada 1 a 1580 de pLS1. Las Horquillas I, II y III; y las tres repeticiones directas (I1-I2-I3) del *dso*, así como los posibles terminadores de transcripción se representan subrayados en el texto; las secuencias -10 y -35 del promotor de los genes *cop* y *rep* (P_{cr}), del promotor del RNAI (P_i) y del promotor del ctRNA II (P_{ct}) se muestran en cajas. Las secuencias de unión a los ribosomas (S.D. y a.r.b.s.) de los genes *copG* y *repB* se representan con líneas discontinuas. Asimismo se muestra la secuencia de aa de las proteínas CopG y RepB, debajo de la correspondiente secuencia de nucleótidos.

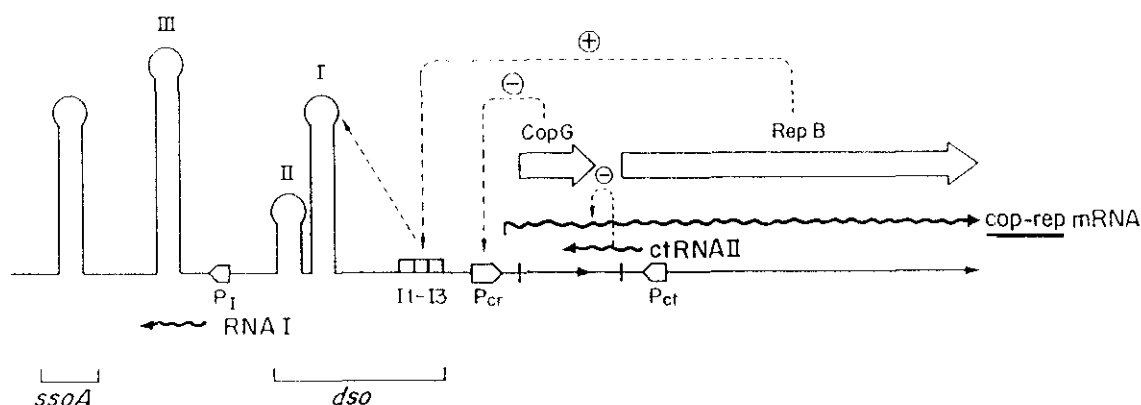


Figura 9. Control de la replicación del plásmido pLS1. Se representan el RNA I y el ctRNA II (líneas onduladas), los promotores P_I , P_{cr} y P_{ct} (cajas con punta de flecha) y las proteínas CopG y RepB (flechas anchas). Se indican las posiciones de los tres iterones (I1-I2-I3; cajas blancas) y las Horquillas I, II y III; así como las regiones correspondientes a los orígenes de replicación *dsO* y *ssoA*. Mediante líneas discontinuas de trazo fino se muestran las interacciones proteína-DNA.

El *sso* de pLS1 es del tipo *ssoA*, está localizado en una región no codificante (Fig. 7). Posee capacidad para formar una estructura secundaria compleja que contiene la secuencia consenso 5'-TAGCGT-3' y el sitio de recombinación interplasmídico específico RS_B (Novick *et al*, 1984; Gruss *et al*, 1987; del Solar *et al*, 1987b, 1993a). La delección del *sso* puede reducir el número de copias plasmídico, causar inestabilidad segregacional y acumulación de ssDNA (del Solar *et al*, 1987b, 1993a). La proteína CopG, codificada por el plásmido, es un represor transcripcional con un motivo HTH (del Solar *et al*, 1989), que regula su propia síntesis y la de la proteína iniciadora, uniéndose a un elemento simétrico de 13 pb situado en la región -35 del promotor P_{cr} (del Solar *et al*, 1990). El determinante de resistencia a Tc, el gen *tet*, presenta homología con el gen *tet* del plásmido pT181 (Khan y Novick, 1983), aunque en el caso de pLS1 su expresión es constitutiva, y no inducible por el antibiótico como en pT181. Por último, hay que señalar la existencia de dos RNAs antisense en pLS1: el RNA I, localizado entre ambos orígenes y de momento, sin función conocida; y el RNA II, ctRNA complementario a la región 5' del mRNA *cop-rep*, que regula a nivel traduccional la síntesis de la proteína iniciadora de la replicación. Un esquema de los circuitos regulatorios descritos para pLS1 se muestra en la Figura 9.

OBJETIVOS

El planteamiento inicial de esta Tesis fue el estudio de las interacciones existentes entre la proteína iniciadora de la replicación del plásmido pLS1, RepB y el origen de doble cadena (*dso*) del plásmido. Antes de comenzar este trabajo ya se había determinado el sitio de corte y se sabía que la proteína RepB se unía *in vitro* a las tres repeticiones del origen. Nos interesaba conocer la especificidad de secuencia de la proteína RepB y profundizar en el estudio de las actividades de corte/cierre y nucleotidiltransferasa de esta proteína. Asimismo era de interés el estudio de la diversidad de sustrato de la proteína, estudiar el *dso* como determinante de incompatibilidad y conocer el papel de los iterones, tanto *in vivo* como *in vitro*, en la replicación del plásmido. Uno de los puntos cruciales fue determinar si tras el corte producido en el origen de replicación por la proteína iniciadora RepB, se establecía una unión covalente proteína-DNA. Además, nos interesaba conocer si la proteína RepB de pLS1 sería capaz de reconocer los orígenes de replicación de otros plásmidos de la misma familia. Por último, se trataría de comenzar la determinación de algunos dominios funcionales de la proteína, mediante la caracterización de deleciones en las regiones N- y C-terminal de la proteína, así como el efecto que tendría el cambio de la Tyr posiblemente implicada en la unión a DNA, sobre las actividades de corte/cierre, nucleotidiltransferasa o de unión a DNA de RepB. Realizando comparaciones de secuencia entre las proteínas Rep de los plásmidos de la familia se determinaron cinco regiones de aa conservadas entre ellas.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1. ESTIRPES BACTERIANAS

Para ensayos de estabilidad e incompatibilidad, así como para la preparación y construcción de plásmidos derivados de pLS1 y de recombinantes basados en pC194cop se usó *S.pneumoniae* 708. Para la construcción y análisis de plásmidos recombinantes basados en pET5 se utilizaron las estirpes C600, MC1061 y BL21 de *E.coli*. Como huésped para la expresión del gen *repB* y derivados, se utilizó *E.coli* BL21(DE3), isogénica de la estirpe BL21 que posee el gen de la RNA polimerasa del fago T7 en el cromosoma (donada por F.W.Studier). En los experimentos de mutagénesis dirigida se utilizaron las siguientes estirpes de *E.coli*: BMH71-18mutS, que suprime *in vivo* la reparación de la mutación, y JM109; ambas fueron suministradas por Promega. La estirpe JM109 se usó también, para el análisis de curvatura del DNA usando el plásmido pBend2 y junto con *E.coli* DH5 α se usó en la construcción y preparación de plásmidos recombinantes basados en el pALTER-1. *B.subtilis* MB11 se utilizó para la determinación del número de copias del plásmido pLS1 y su parental pMV158, a temperaturas de crecimiento del cultivo superiores a 37°C. Las características genotípicas, así como la procedencia de todas las estirpes utilizadas se recogen en la Tabla 2.

2. PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados en este trabajo procedentes del replicón pMV158 fueron: pLS1, pLS4, pLS5, pLS1cop7, pLS5cop11, pLS1 Δ 24cop7, pLS1 Δ A4 y pLS1 Δ A15. Los recombinantes derivados de pC194cop fueron: pJS3cop7, pJS4, pCGA3, pCGA30, pCGA7, pCGA8, pCGA11 y pCGA12. Las construcciones realizadas durante este trabajo basadas en el replicón pLS1 fueron: pLS1 Δ A4-24, pLS1-520, pLS1-520 Ω 4, pLS1-570, pLS1-570 Ω 4 y pLS1BB; y las basadas en pC194cop: pC3BA, pC3BA-520 Ω 4 y pC3BA-570 Ω 4.

Como vectores de clonaje en *E.coli* se utilizaron el pET5 para los plásmidos pLS19, pLS19 Δ N, pLS19 Δ Ni, pLS19 Δ C y pLS19 Δ Ci; y el pALTER-1 para los

plásmidos: pALT-*PstI*b, pALT-*Bam*HI, pALT-*Bgl*II, pALT-*BB*, pALT7:*cr-cat*, pALT7Y99F y pALT7Y99S. Por otra parte, se usó el plásmido pBend2, donado por S.Adhya, para la construcción del plásmido pBend-*dso*.

Otros plásmidos pertenecientes a la familia de pLS1, usados en este trabajo, fueron pE194 y pFX2, procedentes del Bacillus Genetic Stock Center y del Dr. L.E.Pearce, respectivamente. Las características más relevantes de todos estos plásmidos así como de sus parentales, se describen en la Tabla 3.

Tabla 2. Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo.

Estirpe bacteriana	Genotipo	Referencia
<i>S.pneumoniae</i> 708	<i>end-1 exo-2 trt-1 hex-4 malM594</i>	Lacks y Greenberg (1977)
<i>E.coli</i> C600	F' <i>thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44 λ⁻</i>	Bachmann (1972)
<i>E.coli</i> MC1061	<i>hsdR mcrB ΔlacX74 galU galK rpsL thi araD139 Δ(araABC-leu)</i>	Kunkel y Seni (1988)
<i>E.coli</i> BL21	F' <i>r_B⁻m_B⁻ gal ompT</i>	Studier y Moffatt (1986)
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	F' <i>r_B⁻m_B⁻ gal ompT</i> (int::P _{lacUV5} -T7 <i>gen1 inu21 nin5</i>)	Studier y Moffatt (1986)
<i>E.coli</i> BMH71-18 <i>mutS</i>	<i>thi supE Δ(lac-proAB) (mutS::Tn10) (F' proA⁺B⁺ lacI^qZΔM15)</i>	Kramer <i>et al</i> (1984)
<i>E.coli</i> JM109	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17(r_k⁻m_k⁺) relA1 supE44 λ⁻ Δ(lac-proAB) (F' traD36 proA⁺B⁺ lacI^qZΔM15)</i>	Yanisch-Perron <i>et al</i> (1985)
<i>E.coli</i> DH5α	<i>φ80d/lacZΔMIS recA1 endA1 gyrA90 hsdR17 supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169</i>	Raleigh <i>et al</i> (1989)
<i>B.subtilis</i> MB11	<i>lys3 metB10 hisH2</i>	Colección del laboratorio

Tabla 3. Plásmidos empleados en este trabajo.

Plásmido	Tamaño	Marcador	Características	Referencia
(pb)				
pMV158	5536	Tc ^r	Plásmido natural de <i>S.agalactiae</i>	Burdett, 1980
pLS1	4408	Tc ^r	Δ EcoRI B de pMV158 (Δ mob)	Lacks <i>et al</i> , 1986
pLS5	4076	Tc ^r	Delección <i>in vivo</i> de pLS1, Δ (34-365) (Δ mal)	Lacks <i>et al</i> , 1986
pLS4	3438	Tc ^r	Δ HindIII-NcoI pequeño de pLS5 (Δ ssaA, Δ mal)	del Solar <i>et al</i> , 1987b
pLS1cop7	4408	Tc ^r	Transversión C→A, coord.743 en <i>copG</i> de pLS1	del Solar <i>et al</i> , 1987b
pLS5cop11	4080	Tc ^r	Inserción de 4 pb en la coord.607 de pLS5	del Solar y Espinosa, 1992
pLS1 Δ A4	4240	Tc ^r	Delección por BAL31 (Δ 649-816) de pLS1 (Δ copG)	del Solar y Espinosa, 1992
pLS1 Δ 24cop7	3838	Tc ^r	Delección por BAL31 (Δ 4240-401) de pLS1cop7 (Δ mal)	Puyet <i>et al</i> , 1988
pLS1 Δ A4-24	3672	Tc ^r	(Δ 4240-401, Δ mal) (Δ 649-816, Δ copG)	Este trabajo
pLS1 Δ A15	4313	Tc ^r	Delección por BAL31 (Δ 760-854) de pLS1 (Δ copG, Δ repB)	del Solar <i>et al</i> , 1993b
pLS1-520	4408	Tc ^r	Cambio C→A y G→C (coord.522 y 525 de pLS1). Creación del sitio <i>Bam</i> HI	Este trabajo
pLS1-520 Ω 4	4412	Tc ^r	Inserción de 4 pb en la coord.520 de pLS1-520	Este trabajo
pLS1-570	4408	Tc ^r	Cambio T→C en la coord.574 de pLS1. Creación del sitio <i>Bgl</i> II	Este trabajo
pLS1-570 Ω 4	4412	Tc ^r	Inserción de 4 pb en la coord.570 de pLS1-570	Este trabajo
pLS1BB	4408	Tc ^r	Cambio C→A, G→C y T→C en las coord.522, 525 y 574 de pLS1. Creación de los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Bgl</i> II	Este trabajo
pJS37	7315	Tc ^r Cm ^r	Híbrido entre pLS1 y pC194	Ballester <i>et al</i> , 1986
pJS3cop7	4191	Cm ^r	Delección <i>in vivo</i> (Δ 2749-5875) de pJS37. Mutación <i>cop7</i> .	Ballester <i>et al</i> , 1986
pJS4	3354	Cm ^r	Delección <i>in vivo</i> (Δ 1911-5875) de pJS37 (Δ repB)	Ballester <i>et al</i> , 1986

Tabla 3. Plásmidos empleados en este trabajo (continuación).

Plásmido	Tamaño	Marcador	Características	Referencia
(pb)				
pC194	2907	Cm ^r	Plásmido natural de <i>Staphylococcus aureus</i> .	Horinouchi y Weisblum, 1982b
pC194cop	2907	Cm ^r	Mutante de copia de pC194	Ballester <i>et al</i> , 1990
pCGA3	3192	Cm ^r	Fragmento <i>AluI</i> (505)- <i>BglI</i> (804) de pLS1(<i>bind</i> y <i>copG</i>) clonado en <i>HindIII</i> de pC194cop.	del Solar <i>et al</i> , 1989
pCGA30	3144	Cm ^r	(Δ <i>ApaLI-HgaI</i>) pequeño de pCGA3. (<i>bind</i>).	del Solar <i>et al</i> , 1993b
pCGA7	3088	Cm ^r	Fragmento <i>AluI</i> (320)- <i>AluI</i> (505) de pLS1 (<i>nic</i>) clonado en <i>HindIII</i> de pC194cop. (<i>nic</i> ; orientación a)	del Solar <i>et al</i> , 1993b
pCGA8	3088	Cm ^r	<i>Idem</i> (<i>nic</i> ; orientación b)	del Solar <i>et al</i> , 1993b
pCGA11	3139	Cm ^r	Fragmento <i>NcoI-ApaLI</i> pequeño de pLS1 Δ 24cop7 clonado en <i>HindIII</i> de pC194cop. (<i>bind-nic</i> ; orientación b)	del Solar <i>et al</i> , 1993b
pCGA12	3139	Cm ^r	<i>Idem</i> (<i>bind-nic</i> ; orientación a)	del Solar <i>et al</i> , 1993b
pC3BA	3298	Cm ^r	Fragmento <i>BanI-ApaLI</i> de pLS1BB clonado en <i>HindIII</i> de pC194cop	Este trabajo
pC3BA-520 Ω 4	3302	Cm ^r	Inserción de 4 pb en el sitio <i>BamHI</i> de pC3BA	Este trabajo
pC3BA-570 Ω 4	3302	Cm ^r	Inserción de 4 pb en el sitio <i>BglII</i> de pC3BA	Este trabajo
pBR322	4361	Ap ^r Tc ^r	Plásmido de <i>E.coli</i> basado en el replicón ColE1	Bolívar <i>et al</i> , 1977
pET5	~4240	Ap ^r	Vector basado en pBR322	Rosenberg <i>et al</i> , 1987
pLS21	~8310	Ap ^r Tc ^r	Híbrido pLS5-pET5	Lacks <i>et al</i> , 1986
pLS19	~7260	Ap ^r	Deleción de los dos fragmentos <i>BclI</i> menores de pLS21	del Solar <i>et al</i> , 1989
pLS19 Δ N	~5272	Ap ^r	Fragmento <i>XmnI</i> (902)- <i>PvuII</i> (1934) de pLS1 clonado en <i>EcoRI</i> de pET5 (orientación a)	Este trabajo
pLS19 Δ Ni	~5272	Ap ^r	<i>Idem</i> al anterior (orientación b)	Este trabajo

Orientación a: clonado según la dirección de la expresión del gen de resistencia a antibiótico (cat o bla).Orientación b: clonado en dirección contraria a la expresión del gen de resistencia a antibiótico (cat o bla).

Tabla 3. Plásmidos empleados en este trabajo (continuación).

Plásmido	Tamaño	Marcador	Características	Referencia
(pb)				
pLS19ΔC	~4956	Ap ^r	Fragmento <i>Apa</i> LI- <i>Ssp</i> I de pLS1 clonado en <i>Eco</i> RI de pET5 (orientación a)	Este trabajo
pLS19ΔCi	~4956	Ap ^r	<i>Idem</i> al anterior (orientación b)	Este trabajo
pALTER-1	5680	Tc ^r	Fagémido con el ori de f1	Promega
pALT- <i>Pst</i> IIb	6731	Tc ^r	Fragmento <i>Pst</i> I menor de pLS1 clonado en <i>Pst</i> I del pALTER-1 (orientación b)	Acebo, P.
pALT- <i>Bam</i> HI	6731	Tc ^r Ap ^r	Creación del sitio <i>Bam</i> HI en la coord. 520 del fragmento de pLS1 clonado en pALT- <i>Pst</i> IIb	Este trabajo
pALT- <i>Bgl</i> II	6731	Tc ^r Ap ^r	Creación del sitio <i>Bgl</i> II en la coord. 570 del fragmento de pLS1 clonado en pALT- <i>Pst</i> IIb	Este trabajo
pALT-BB	6731	Tc ^r Ap ^r	Creación de los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Bgl</i> II en las coord. 520 y 570 del fragmento de pLS1 clonado en pALT- <i>Pst</i> IIb	Este trabajo
pALT7: <i>crcat</i>	7545	Cm ^r	Fragmento <i>Hgi</i> AI- <i>Cla</i> I mayor de pJS3 ligado al fragmento mayor <i>Pst</i> I- <i>Cla</i> I de pALTER-1	del Solar, G.
pALT7Y99F	7545	Cm ^r Ap ^r	Cambio A→T en la coord. 2278 del fragmento de pJS3 clonado en pALT7: <i>crcat</i> (cambio Tyr99 de RepB a Phe)	Este trabajo
pALT7Y99S	7545	Cm ^r Ap ^r	Cambio A→C en la coord. 2278 del fragmento de pJS3 clonado en pALT7: <i>crcat</i> (cambio Tyr99 de RepB a Ser)	Este trabajo
pBend2	~2693	Ap ^r	Vector de clonaje basado en pBR322	Kim <i>et al</i> , 1989
pBend- <i>dso</i>	~3086	Ap ^r	Fragmento <i>Ban</i> I- <i>Apa</i> LI menor de pMV158 clonado en el sitio <i>Sal</i> I de pBend2 (orientación b)	Este trabajo
pE194	3728	Em ^r	Plásmido de <i>S.aureus</i>	Horinouchi y Weisblum, 1982a; Villafane <i>et al</i> , 1987
pFX2	3536	Cm ^r	Plásmido de <i>Lactococcus lactis</i>	Xu <i>et al</i> , 1991

Orientación a: clonado según la dirección de la expresión del gen de resistencia a antibiótico (cat, tet o bla).

Orientación b: clonado en dirección contraria a la expresión del gen de resistencia a antibiótico (cat, tet o bla).

3. BACTERIÓFAGOS

Se usó el bacteriófago R408 (Promega) para infectar los cultivos de JM109/pALT-*Pst*Ib y obtener ssDNA para mutagenizar *in vitro*.

4. PROTEÍNAS

La DNA polimerasa I de *E.coli* y su fragmento Klenow (Pol IK), así como la mayoría de los enzimas de restricción y la DNA ligasa concentrada del fago T4, fueron suministrados por New England Biolabs. La fosfatasa alcalina de intestino de ternera, la DNA ligasa del fago T4, la fosfodiesterasa de veneno de serpiente (PDE) y la nucleasa P1 fueron suministrados por Boehringer Mannheim. La polinucleótido quinasa del fago T4 (T4 PNK), la transferasa terminal y la RNA ligasa del fago T4, fueron de Amersham Internacional. Pharmacia LKB suministró la DNA polimerasa del fago T7. Otras proteínas utilizadas, suministradas por Sigma, fueron: proteinasa K, RNasa A, lisozima, pronasa, seroalbúmina bovina (fracción V; BSA) y los marcadores de peso molecular. Las soluciones tampón de los enzimas de restricción fueron las recomendadas en cada caso por las firmas comerciales.

El represor transcripcional CopG fue purificado a homogeneidad por la Dra. del Solar (del Solar *et al*, 1989), la proteína SSB (3.2 mg/ml) fue de United States Biochemical Corporation y la topoisomerasa I de Promega.

5. MEDIOS DE CULTIVO

Los componentes de los medios de cultivo fueron suministrados por las casas comerciales: Probus, Merck y Difco.

5.1. Medio de cultivo de *S.pneumoniae*

Para el crecimiento de *S.pneumoniae* en medio líquido se utilizó el medio AGCH (Lacks, 1966) suplementado, en el momento de inocular, con 0.3% de sacarosa y 0.2% de extracto de levadura. Cuando fue necesario, se añadieron los antibióticos correspondientes a las siguientes concentraciones finales: tetraciclina (Tc) 1 µg/ml y cloramfenicol (Cm) 1.5-3 µg/ml. Para el crecimiento en medio sólido, se mezclaron

las células y los antibióticos correspondientes con una capa basal compuesta por AGCH, sacarosa al 0.3%, extracto de levadura al 0.2% y agar al 1%. Una vez solidificada esta capa, se añadió una capa superficial compuesta por AGCH y agar al 0.75%. Dada la complejidad del medio AGCH, se detalla a continuación su composición.

Medio AGCH

Hidrolizado ácido de caseína	5 g
Hidrolizado enzimático de caseína	1 g
L-cisteína-HCl	40 mg
L-triptófano	6 mg
L-asparagina	50 mg
L-glutamina	10 mg
Adenina	5 mg
Cloruro de colina	5 mg
Pantotenato cálcico	1.2 mg
Acido nicotínico	0.3 mg
Piridoxina-HCl	0.3 mg
Tiamina-HCl	0.3 mg
Riboflavina	0.14 mg
Biotina	0.6 mg
K ₂ HPO ₄	8.5 g
NaC ₂ H ₃ O ₇	1.25 g
NaHCO ₃	0.4 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.5 g
CaCl ₂	0.6 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.5 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.2 mg
Albúmina bovina (fracción V)	0.5 g
Catalasa	3000 u
Agua destilada y desionizada c.s.p.	1 l
pH 7.5	

5.2. Medios de cultivo de *E.coli*

Para el crecimiento de las estirpes de *E.coli* en medio líquido se utilizó normalmente el **medio TY** (Maniatis *et al*, 1982): 1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.5% NaCl; suplementado o no, con las concentraciones de antibióticos siguientes: Tc 15 µg/ml, Cm 15 µg/ml y ampicilina (Ap) 50-200 µg/ml. Para el

crecimiento en placa se suplementó el medio TY con agar al 1.5%. Durante la infección de los cultivos con el bacteriófago R408, para la obtención de ssDNA, aquellos se crecieron en **medio TYP** (Promega): 1.6% bacto-triptona, 1.6% extracto de levadura, 0.5% NaCl y 0.25% K_2HPO_4 . Para la puesta en competencia y transformación de las estirpes de *E.coli* se utilizaron los medios **Penassay** (Antibiotic-Medium nº 3, Difco) y **SOB** (Hanahan, 1983): 2% bacto triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$. En la recuperación de las células, tras la electroporación, se utilizó el **medio SOC** (Bio-Rad): medio SOB suplementado con 20 mM glucosa.

Los cultivos de *E.coli* destinados a la expresión y purificación de proteínas se crecieron en el **medio mínimo M9** (Miller, 1972): 42.3 mM Na_2HPO_4 , 22 mM KH_2PO_4 , 8.5 mM NaCl y 18.7 mM NH_4Cl ; ajustados a pH 7.4 y esterilizados por separado del resto de los componentes: 0.1 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgSO_4$, 0.2% glucosa y los antibióticos correspondientes.

5.3 Medio de cultivo de *B.subtilis*

Para el crecimiento en medio líquido de *B.subtilis* se utilizó el **medio TY** (Maniatis *et al*, 1982) suplementado con Tc 10 µg/ml.

6. REACTIVOS Y OTROS PRODUCTOS

De la casa Merck, se emplearon: cloroformo, fenol, etanol, isopropanol, 1-butanol, amoníaco concentrado, formamida, Tris, EDTA, DMSO y TCA. De la casa Sigma, se adquirieron: Cm, Tc, DTT, HEPES, MOPS, tRNA de *E.coli*, DNA de timo de ternera, DNA de esperma de salmón, camptotecina, cloroquina y β NMN. Boehringer Mannheim suministró: Ap, IPTG y los dNTPs no radiactivos. Pharmacia, los Sephadex G-25 y G-50. La agarosa fue suministrada por Pronadisa y Bio-Rad. Esta casa también suministró: acrilamida, bis-acrilamida, heparina-agarosa, TEMED y SDS. El β ME fue de la casa Eastman-Kodak, el PSA de BRL, la Heparina 1% de Laboratorios LEO S.A., el Na-DOC de Difco, el detergente Tween 20 de la casa Janssen y el Octil- β -D-glucopyranósido de la Corporación Calbiochem-Novabiochem. Amersham suministró el material radiactivo y el kit de marcaje en el extremo 3'.

Otros "kits" comerciales utilizados en este trabajo fueron: kit de secuenciación de la DNA polimerasa del fago T7 (Pharmacia); Sistema de mutagénesis *in vitro* (Promega); "GeneClean" y "MERmaid" (BIO 101), para la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa y de poliacrilamida; y el kit para determinación de proteínas, BCA (Pierce). Otros productos usados fueron: membranas de nitrocelulosa para la transferencia de DNA (Schleicher & Schuell); filtros para diálisis (Millipore); película fotográfica T-55 (Polaroid), y películas X-Omat S para autorradiografías (Kodak).

MÉTODOS

1. CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE ESTIRPES BACTERIANAS

El cultivo en medio líquido de *S.pneumoniae* se realizó a 37°C sin agitación, en tubos de tamaño adecuado para mantener las condiciones microaerófilas necesarias para el crecimiento de esta estirpe. Para el cultivo en medio sólido, las células de *S.pneumoniae* se mezclaron con una capa basal de medio y antibiótico, a la cual se agregó una ligera capa superficial de medio. Para el recuento de bacterias se tuvo en cuenta que en *S.pneumoniae* cada u.f.c. contiene una media de cuatro células (López *et al*, 1989). El crecimiento de las estirpes de *B.subtilis* y *E.coli* se realizó a 37°C con agitación vigorosa. En algunas ocasiones, la temperatura de crecimiento de *B.subtilis* se elevó a 45 y 50°C, temperaturas a las que la bacteria crece bien por su condición de microorganismo mesófilo. El cultivo en medio sólido se realizó en superficie sobre placas petri con TY-agar.

El crecimiento de los cultivos se siguió por turbidimetría usando un espectrofotómetro Bausch & Lomb, modelo Spectronic 20. Se midieron las absorbancias de los cultivos de *B.subtilis*, *E.coli* y *S.pneumoniae* a las longitudes de onda de 550, 600 y 650 nm respectivamente. Para su conservación, a los cultivos de *S.pneumoniae* y *E.coli* se les añadió glicerol al 10% y se mantuvieron 10 min a 37°C, antes de ser congelados a -70°C. A las células de *B.subtilis* se les añadió DMSO al 5% y se congelaron rápidamente en una mezcla de nieve carbónica y etanol, antes de ser mantenidas a -70°C.

2. PREPARACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Las células competentes de *S.pneumoniae* se prepararon siguiendo el método descrito por Lacks (1966). Se realizan dos diluciones sucesivas de un cultivo de *S.pneumoniae*, y se deja crecer hasta una $DO_{650} = 0.3$. En este momento, el cultivo se reparte en alícuotas (500 μ l) y se congela a -70°C . Para su transformación, el cultivo competente se diluye 20 veces en AGCH, suplementado con 0.2% sacarosa y 0.001% CaCl_2 , incubándose 20 min a 30°C . La saturación con DNA plasmídico se alcanza alrededor de 0.25 μg . Una vez añadido este DNA, se incuba 40 min más a 30°C . Para permitir la expresión del marcador de selección, el cultivo se mantiene 90 min a 37°C antes de proceder a la siembra en placa para seleccionar los transformantes. Dado que los genes de resistencia a Cm (*cat*) empleados en este trabajo derivan de pC194, y son inducibles por Cm, los últimos 20 min de expresión se realizaron en presencia de una concentración subinhibitoria del antibiótico (0.05-0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Para preparar las células competentes de *E.coli* se siguieron los métodos de Hanahan (Hanahan, 1983) y Kushner (Kushner, 1978). En ambos casos, se transformó con un máximo de 0.2 μg de DNA, correspondientes a 1/20 del volumen de células utilizado. Sólo en el caso de usar el método de Hanahan las células competentes se pudieron conservar a -70°C . En algunos casos, las células de *E.coli* se transformaron por electroporación siguiendo el método descrito por Dower (Dower *et al*, 1988) y utilizando el aparato "Gene Pulser" acoplado a un controlador "Pulse Controller" de Bio-Rad. Para preparar las células de *E.coli* para la electro-transformación se inocularon 100 ml de medio con 1/100 de volumen de un cultivo muy crecido, y se permitió su crecimiento a 37°C con agitación vigorosa hasta una $DO_{600} = 0.5$. El cultivo se enfrió en hielo durante 30 minutos y las células fueron recogidas por centrifugación (15 min, 4°C , 4000 x g). Las células se lavaron dos veces con agua destilada estéril fría, centrifugándolas de la misma forma. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células suavemente en 2 ml de glicerol al 10% frío. Se realizó una nueva centrifugación (15 min, 4°C , 2000 x g) y las células se resuspendieron con mucha suavidad en 0.25 ml de glicerol al 10% frío. La concentración final de células fue aproximadamente de $1-3 \times 10^{10}$ células/ml. El cultivo se repartió en alícuotas (200 μ l) que se congelaron a -70°C . Para su transformación las células se mezclaron con 1

ó 2 μ l de DNA (7.5-10 μ g/ml). Las condiciones del electroporador fueron las siguientes: 25 μ F, 2.5 kV y 200 Ω . Las células se diluyeron en 1 ml de SOC y se incubaron a 37°C durante 1 h, antes de ser extendidas en placas con un medio selectivo para aislar los transformantes.

3. PREPARACIONES DE DNA

3.1. Preparaciones de DNA total

Se utilizó para analizar de modo rápido el contenido plasmídico de los clones en estudio, y para determinar por densitometría el número de copias plasmídico (N) en las estirpes analizadas.

Para *S.pneumoniae* se empleó el procedimiento de Stassi *et al* (1981): las células de un cultivo crecido a $DO_{650} = 0.4$ (1.5 ml) se sedimentaron por centrifugación y resuspendieron en 100 μ l de solución de lisis (25% sacarosa, 0.15 M citrato trisódico, 0.01% SDS, 0.1% Na-DOC, 25 μ g/ml RNasa A). Se incubó 10 min a 30°C y se añadió SDS (1%, concentración final). Los lisados se mezclaron vigorosamente y se congelaron (-70°C) y descongelaron (37°C) cuatro veces, favoreciendo así la rotura del DNA cromosómico. Se añadió proteinasa K (230 μ g/ml) y se dejó actuar 20 min a 37°C. Se añadieron 50 μ l del colorante de carga CEC(3x) [0.02% azul de bromofenol (BFB), 50% glicerol, 2.5 mM EDTA], y se almacenaron a -70°C hasta la electroforesis.

En el caso de *E.coli* (Espinosa *et al*, 1982), las células de resuspendieron en 25 μ l de solución de lisis (4 mg/ml lisozima, 25% sacarosa, 0.1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 μ g/ μ l RNasa A) y se incubó 10 min a 37°C. Se añadió 1% SDS y se mezcló vigorosamente antes de congelar-descongelar cuatro veces. Se añadió proteinasa K a 250 μ g/ml y se dejó actuar 10 min a t.a. Se añadieron 15 μ l del colorante de carga CEC(3x) y se procedió a la electroforesis. Para *B.subtilis*, los extractos totales se realizaron como en el caso de *E.coli*, aunque aumentando cuatro veces las cantidades de reactivos utilizados para el mismo volumen de células.

3.2. Minipreparaciones de DNA plasmídico

La preparación de DNA plasmídico de *E.coli* a pequeña escala, se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Birboim y Doly (1979), basado en una

desnaturalización alcalina y posterior precipitación del DNA cromosómico. En el caso de *S.pneumoniae* se siguió el mismo método incluyendo las modificaciones descritas por Stassi *et al* (1981). En alguna ocasiones, para *E.coli* se siguió el método de lisis alcalina descrito por le Gouill *et al* (1994), elegido por su rapidez y sencillez para el análisis inicial de un gran número de transformantes.

3.3. Preparación de plásmidos puros

Para la preparación de DNA plasmídico de *E.coli* y *S.pneumoniae* a gran escala, se utilizó el método de Currier y Nester (1976). La diferencia entre los dos microorganismos se encuentra básicamente en el procedimiento de lisis celular empleado:

La lisis de *E.coli* se llevó a cabo resuspendiendo las células en una solución de lisis (2mg/ml lisozima, 20% sacarosa, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) e incubándolas 10 min a 37°C. Después de añadió EDTA (0.1 M, concentración final) y se mantuvo en hielo 10 min. La lisis clara se consiguió añadiendo una solución de SDS en TE(10:1) (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA), hasta alcanzar una concentración final de SDS al 5 %, e incubando a 37°C durante 10 min.

Para la lisis de *S.pneumoniae*, las células se resuspendieron en 60 mM EDTA junto con la solución de lisis (25% sacarosa, 0.15 M citrato trisódico, 0.1% Na-DOC, 0.01% SDS). Se incubó a 37°C durante 5 min; se añadió pronasa (concentración final, 0.7 mg/ml) y se incubó a 37°C durante 10 min. La lisis clara se obtuvo añadiendo una solución de SDS en TE(10:1), dejándolo a una concentración final de SDS del 1.2%.

Una vez obtenida la lisis clara, se siguió el protocolo descrito por los autores, realizando dos gradientes sucesivos de CsCl para asegurar una separación y eliminación completa del DNA cromosómico. La estimación de la pureza del DNA obtenido se obtuvo de la relación entre los valores de absorbancia a las longitudes de onda 258 y 280 nm. La contaminación con proteínas o fenol se reflejaría en un valor de la relación < 2 . La concentración del DNA se calculó midiendo la absorbancia (A) de la muestra a una longitud de onda de 258 nm, teniendo en cuenta que un valor de absorbancia igual a 1 corresponde a 50 $\mu\text{g/ml}$ de dsDNA.

4. MANIPULACIONES ENZIMÁTICAS DEL DNA

El tratamiento del DNA con enzimas de restricción se realizó en las condiciones de tampón y temperatura recomendadas por las casas comerciales suministradoras. Otras modificaciones enzimáticas del DNA se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones descritas por Sambrook *et al* (1989). Cuando fue posible los enzimas se inactivaron por calor y en la mayoría de los casos, se llevó a cabo una desproteinización de las muestras por tratamiento con una mezcla (1:1) de fenol saturado en TE(10:1) y de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Por centrifugación, se separó la fase acuosa que contiene el DNA y se procedió a su precipitación con 0.1 volúmenes de 3 M acetato sódico, pH 7.0 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Si la cantidad de DNA era inferior a 2 μ g, se añadieron 5 μ g de tRNA como coprecipitador. La mezcla se mantuvo durante 30 min a -70°C o durante toda la noche a -20°C, y se sedimentó por centrifugación a -10°C, 15 min. Para eliminar las sales que podrían haber coprecipitado con el DNA, se realizó un lavado con etanol al 70% y se centrifugó a -10°C, 10 min. El DNA sedimentado se secó bajo vacío para evaporar los restos de etanol de la muestra y se resuspendió en TE(10:1).

Muchas veces, las muestras de DNA se dializaron en filtros tipo VS de Millipore (tamaño del poro 0.025 μ m) frente al mismo tampón TE(10:1) o al tampón adecuado para realizar una nueva digestión.

5. ELUCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

Para la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se utilizó el sistema "GeneClean" (BIO 101 Inc.), siguiendo las instrucciones de sus fabricantes. Normalmente, se utilizaron geles de agarosa al 0.8%; aunque este porcentaje se aumentó en el caso de extracción de fragmentos de un tamaño similar entre sí, con el fin de conseguir una mayor resolución en la separación.

Cuando los fragmentos de DNA eran pequeños (<200 pb) se llevó a cabo su extracción a partir de geles de poliacrilamida (PAA) al 5%, según el procedimiento de Maxam y Gilbert (1980). En este caso se troceó la banda de PAA y se sumergió en el tampón de elución (0.2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA). Se

incubó a 42°C toda la noche. El DNA se eluyó y se eliminaron los restos de PAA pasando las muestras a través de una columna de lana de vidrio. Se cambió el tampón de la muestra pasándola a través de una columnilla de Sephadex G-25 equilibrada en TE(10:1) y, cuando fue necesario, la muestra se concentró con un volumen de 1-butanol, descartando la fase superior hasta alcanzar el volumen deseado.

6. PURIFICACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

La mayoría de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por el servicio de Química de Proteínas del CIB. Los oligos se entregaron unidos a una resina, de la cual eran recuperados por un tratamiento con 32% NH_3 e incubación durante 14 horas a 50°C. Se eliminó el amoníaco por evaporación a vacío y se resuspendió el oligo en TE(10:1), purificándolo posteriormente mediante una columna de Sephadex G-50 o G-25 (para oligos menores de 16 nucleótidos). En algunas ocasiones, con el objeto de eliminar las moléculas truncadas o de síntesis incompleta, se retuvo el grupo tritilo de la última base incorporada y se purificaron los oligos utilizando los cartuchos para purificación de oligonucleótidos OPC de Applied Biosystems, para su detritilación.

Para la extracción de oligonucleótidos marcados a partir de geles de PAA se utilizó el sistema "MERmaid" (BIO 101 Inc.). Cuando los ensayos requerían una mayor pureza de los oligonucleótidos, estos fueron purificados por HPLC por el servicio de Química de Proteínas del CIB, usando una columna Vydac C-18 (4.5 x 15 cm) de la casa The Separation Group, con un tamaño de partícula de 5 μm y 30 nm de tamaño de poro. El flujo fue de 1 ml/min y se utilizaron las soluciones A (5% acetonitrilo en 0.1 N TEAA, pH 7.0) y B (40% acetonitrilo en 0.1 N TEAA, pH 7.0). Los oligos fueron posteriormente detritilados: para ello, se evaporaron las muestras y se resuspendieron en ácido acético al 80%, incubándolas 20 min a temperatura ambiente. Las muestras se volvieron a evaporar o se pasaron por una columna de Sephadex G-50, lavándolas a continuación, varias veces con agua destilada.

Los oligonucleótidos tio-derivados fueron sintetizados y purificados por el Dr. Ramón Eritja en el European Molecular Biology Laboratory. Se purificaron por

HPLC con las condiciones descritas por Mizuuchi y Adzuma (1991): columna C-18, cargando la muestra en 10% acetonitrilo, 90% 50 mM acetato de amonio/agua y eluyendo los oligonucleótidos con 30% acetonitrilo. De esta forma se pueden separar las dos configuraciones del oligonucleótido fosforotioato: la forma S_p del diastereoisómero migra más rápido que la forma R_p .

En todos los casos, la concentración de los oligonucleótidos se calculó midiendo la absorbancia a 258 nm y teniendo en cuenta que una $A_{258} = 1$ corresponde a 33 $\mu\text{g/ml}$ de ssDNA.

7. SECUENCIACIÓN DEL DNA

Para la secuenciación de mutaciones en el DNA, se siguió el método de terminación de cadena de Sanger (Sanger *et al*, 1977), utilizando el "kit" comercial de Pharmacia LKB con la DNA polimerasa del fago T7 y $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$. Como DNA molde se usaron aproximadamente 2 μg de una minipreparación plasmídica, desnaturalizados por álcali. Como cebadores se usaron oligos de 17 nt y la relación cebador:molde usada fue de 10:1.

8. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

La introducción de sitios de restricción en el *dso* de pLS1 o las mutaciones puntuales realizadas en el gen *rep* de pLS1, se llevaron a cabo utilizando el sistema de mutagénesis dirigida *in vitro* de Promega. El sistema se basa en la utilización de un vector único, pALTER-1. Este fagémido contiene el *ori* del fago f1 y dos genes de resistencia a antibióticos: el gen de resistencia a Tc (*tet*) que es siempre funcional, y el gen de resistencia a Ap (*bla*) que ha sido inactivado. El oligo mutagénico se anilla al ssDNA molde junto con un oligo que restaura la Ap^r en la hebra mutante durante la reacción de mutagénesis. Se sintetiza la hebra mutante usando la DNA polimerasa y la DNA ligasa del fago T4. A continuación, se realizan dos rondas sucesivas de transformación: primero, se utiliza una estirpe de *E.coli* deficiente en el sistema de reparación de bases erróneas (BMH71-18*mutS*), la cual suprime *in vivo* la reparación del error mutagénico, introducido en el gen *bla* y en el fragmento de DNA deseado.

Después, se realiza una segunda ronda de transformación en la estirpe JM109, para asegurar la segregación de los plásmidos mutantes.

El procedimiento seguido fue el siguiente: el fragmento de DNA a mutagenizar se clonó en el sitio de clonaje múltiple del vector pALTER-1 y se transformó la estirpe JM109. El DNA molde para la reacción de anillamiento con los oligos mutagénicos se obtuvo mediante dos formas distintas: a) infección del cultivo JM109/pALTER recombinante con el fago R408 para la obtención de ssDNA, usando una multiplicidad de infección (m.o.i., nº partículas de fago/célula) de 10; el DNA fágico junto con el DNA del fagémido recombinante fue precipitado según las instrucciones de Maniatis *et al* (1982); b) obtención del DNA plasmídico según Birboim y Doly (1979) y su desnaturalización por álcali. Por lo general, la reacción de mutagénesis se llevó a cabo anillando 0.1 pmol de ssDNA o dsDNA desnaturalizado con 0.5 pmol del oligo reparador de Ap fosforilado y 2.5 pmol del oligo mutagénico fosforilado. En cualquier caso, se mantuvieron unas relaciones oligo:molde de 5:1 para el oligo reparador de Ap y de 25:1 para el oligo mutagénico. La hebra mutante se extendió con la DNA polimerasa del fago T4 y se selló con la DNA ligasa del fago T4. Con el DNA así sintetizado se transformó la BMH71-18*mutS* siguiendo el método de Hanahan (1983) o mediante electroporación (Dower *et al*, 1988). Se seleccionaron los transformantes Ap^r por crecimiento en presencia de este antibiótico y se obtuvo el DNA por el método de Birboim y Doly (1979). Se transformó la estirpe JM109 para asegurar la segregación de los fagémidos mutantes. Posteriormente, la presencia de la mutación deseada se comprobó por secuenciación del fragmento de DNA correspondiente.

9. ELECTROFORESIS DE DNA

9.1. Geles de agarosa

Para la electroforesis del DNA en geles de agarosa se utilizaron geles horizontales con una concentración de agarosa variable entre 0.8 y 1.5%, dependiendo del tamaño del DNA a analizar. La agarosa se disolvió en tampón de electroforesis TAE (40 mM Tris base, pH 8.1, 20 mM ácido acético, 2 mM EDTA) o TBE (89 mM Tris base, pH 8.3, 89 mM ácido bórico, 2.5 mM EDTA). A las muestras se les añadió

tampón de carga BXGE (0.025% BFB, 0.025% xilencianol, 6% glicerol, 1 mM EDTA) o CEC(1x). Las dimensiones de los geles, la duración de la electroforesis y las condiciones de voltaje variaron según las características del DNA a analizar. Los geles fueron teñidos en tampón TAE o TBE usado para la electroforesis añadiéndole bromuro de etidio (EtBr) a una concentración de 0.5-1.0 $\mu\text{g/ml}$, durante 30 min a t.a. En algunos casos, el EtBr se incluyó en la preparación del tampón y en el gel de agarosa, obteniéndose así la tinción del DNA durante la electroforesis. El DNA se visualizó mediante un transiluminador de luz ultravioleta (UV) de onda larga (360 nm) o de onda corta (254 nm).

9.2. Geles de poliacrilamida nativos

Para la electroforesis de fragmentos de DNA pequeños (50-500 pb) se utilizaron geles verticales no desnaturalizantes de 5% poliacrilamida (PAA; 30% acrilamida:0.8% bisacrilamida) en tampón TAE, polimerizando con 0.05% TEMED y 0.1% persulfato amónico (PSA). Las dimensiones de los geles variaron según el volumen de las muestras a analizar y la resolución de los fragmentos que se pretendía. Los geles grandes fueron de 14.5 cm de ancho, 12 cm de largo y 1 mm de espesor. Los geles pequeños se prepararon utilizando las cubetas "Mini-protean" de Bio-Rad y sus dimensiones fueron: 8.4 cm de ancho, 7.2 cm de largo y 0.75 mm de espesor. Para la electroforesis, las muestras se prepararon y tiñeron como en el apartado anterior, utilizando el tampón de carga BXGE. Para analizar las diferencias en la movilidad electroforética de un oligonucleótido mono- y bicatenario de 23 nt marcado con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ en su extremo 5', se realizó un gel grande de 20% PAA, en tampón TAE, añadiendo 0.05% TEMED y 0.1% PSA. Las muestras se prepararon con tampón BXGE y se visualizaron por exposición autorradiográfica usando pantallas amplificadoras.

9.3. Geles de agarosa alcalinos

Este tipo de geles se preparó siguiendo el método descrito por Sambrook *et al* (1989), modificado por la Dra. P. López. Se prepara un gel de agarosa al 0.8% en agua y se deja enfriar a 60°C antes de añadirle la solución alcalina (50 mM NaOH, 1 mM EDTA). Las muestras se diluyen 1:1 con colorante para geles desnaturalizantes 2x (100 mM NaOH, 10 mM EDTA, 6% ficoll, 0.025% verde de bromocresol, 0.5%

xilencianol). El tampón de electroforesis contiene 50 mM NaOH y 1 mM EDTA. La electroforesis se realiza a un voltaje constante bajo (30-40 V) ya que este tipo de geles presenta el problema de una gran resistencia. En parte, esto se puede solucionar realizando la electroforesis a 4°C y/o con recircularización del tampón. Tras la electroforesis, el gel se sumerge en una solución de neutralización (1 M Tris-HCl, pH 7.6, 1.5 M NaCl) durante 30 min a t.a. Para visualizar el DNA, se sumerge el gel en tampón TAE con EtBr (1 µg/ml), 30 min a t.a., y se observa en un transiluminador UV de 254 nm. Si se quiere transferir el DNA a filtros de nitrocelulosa, se vuelve a sumergir el gel en la solución de neutralización durante otros 30 min, antes de hacer la transferencia.

9.4. Geles mixtos de agarosa-acrilamida

Este tipo de geles son adecuados para el análisis de complejos DNA-proteínas o de curvaturas en el DNA. La preparación de estos geles se realizó siguiendo el método descrito por Peacock y Dingman (1968). Son geles verticales de 1.8% acrilamida-0.5% agarosa, polimerizándose con 0.02% TEMED y 0.1% PSA. Sus dimensiones fueron de 14 cm de ancho, 16 cm de largo y 3 mm de espesor. La electroforesis se realizó a t.a. en tampón TAE.

9.5. Geles mono- y bidimensionales con cloroquina

Para la separación de topoisómeros de una preparación de DNA plasmídico puro se realizaron geles de agarosa con cloroquina como agente intercalante del DNA.

Los geles monodimensionales se realizaron según Bhriain y Dorman (1993). Se prepararon geles de agarosa al 1% con 2 µg/ml de cloroquina. La electroforesis se realizó en tampón TBE, a un voltaje constante de 2.7 V/cm, a t.a. y protegido de la luz. La cloroquina se eliminó mediante lavados exhaustivos con agua destilada y los geles se tiñeron con 5 µg/ml EtBr durante 1 h, lavándolos posteriormente después con agua destilada para eliminar el fondo de EtBr.

Para la separación de topoisómeros positivos y negativos, se realizaron geles bidimensionales tomando como referencia el trabajo de Chen *et al* (1994). La primera dimensión se realizó en geles de agarosa al 0.8% con 1.5 µg/ml de cloroquina en

tampón TBE. Para la segunda dimensión, se cortó la tira de gel que llevaba la muestra y se giró 90° en otra cubeta, la cual se rellenó con una preparación de agarosa al 1% con 15 µg/ml de cloroquina. El tampón de electroforesis fue TBE con cloroquina 15 µg/ml. Tras la segunda electroforesis, los geles se lavaron con agua destilada y se tiñeron con EtBr (1 µg/ml) durante 1 h, lavándolos a continuación con agua destilada antes de ser visualizados con un transiluminador UV de onda corta (254 nm).

9.6. Geles de secuenciación

Los productos de las reacciones de secuenciación se sometieron a electroforesis en geles de 8% PAA (38% acrilamida:2% bisacrilamida), con 7 M urea, polimerizando con 0.05% TEMED y 0.06% PSA, en tampón TBE. Los productos de reacción en los ensayos de actividad de la proteína RepB con oligonucleótidos, se analizaron en geles de 20% PAA (38% acrilamida:2% bisacrilamida), con 8 M de urea, 0.02% TEMED y 0.06% PSA, en tampón TBE. Para los análisis de los oligonucleótidos con nucleasa P1 o PDE, se utilizaron geles de 24% poliacrilamida con urea al 50% (8.3 M).

En todos los casos, las dimensiones de los geles fueron 36 cm de ancho, 40 cm de largo y 0.35 mm de espesor. Las muestras fueron resuspendidas en tampón de carga BXF (80% formamida desionizada, 10 mM NaOH, 0.1% BFB, 0.1% xilencianol, 1 mM EDTA) y se desnaturalizaron por calor durante 3 min a 85°C, enfriándolas rápidamente a 4°C. Se realizó una pre-electroforesis a 1800 V durante 1 h. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 1900 ó 2000 V.

10. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS PLASMÍDICO

La determinación del número de copias plasmídico (N) en un huésped concreto y a unas condiciones dadas, se basó fundamentalmente en el método descrito por Projan *et al* (1983), con las modificaciones descritas por del Solar y Espinosa (1992). Se prepararon extractos de DNA total de los cultivos a analizar y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.2% con tampón TAE. Los geles se tiñeron 30 min a t.a. con 1 µg/ml EtBr, y fueron lavados con agua destilada durante otros 30

min, para eliminar la fluorescencia de fondo. Los geles se expusieron a un transiluminador UV de onda corta, y se tomaron varias fotografías con diferentes tiempos de exposición, utilizando películas T-55 de Polaroid. La cuantificación densitométrica de las bandas de DNA, se realizó utilizando unas veces el densitómetro LKB Ultrosan 2202 acoplado a un ordenador Apple II y, más recientemente, un densitómetro 400, usando el programa ImageQuant (Molecular Dynamics).

Debido a que el grupo planar del EtBr se intercala mejor en las formas lineales y circulares abiertas (OC o FII), que en formas circulares covalentemente cerradas (CCC o FI), fue necesario aplicar un factor de corrección en el cálculo del número de moléculas de DNA plasmídico por equivalente cromosómico. Este factor de corrección fue estimado por Projan *et al* (1983) en 1.36. De esta manera, el valor de N se calculó:

$$N = \frac{(Dp_1 + 1.36 Dp_2) \times Mc}{Dc \times Mp}$$

siendo Dp_1 y Dp_2 , los valores determinados por densitometría a las bandas correspondientes a las formas OC y CCC del plásmido; Mc , es el tamaño del DNA genómico, estimado en 3×10^6 pb para las tres especies bacterianas en estudio (Lacks *et al*, 1986); Dc , es el valor determinado por densitometría para la banda de DNA genómico; y Mp , es el tamaño del DNA plasmídico en pb.

11. ENSAYOS DE ESTABILIDAD E INCOMPATIBILIDAD PLASMÍDICAS

11.1 Ensayos de estabilidad

Se realizaron según el método descrito en del Solar *et al* (1987b). Se partió de un cultivo inicial crecido hasta una $DO_{650} = 0.4$ en medio selectivo, al cual se le consideró la generación de partida ($g=0$). A partir de aquí, se realizaron diluciones sucesivas en una proporción 1:10³, en un medio sin presión selectiva hasta alcanzar de nuevo la $DO_{650} = 0.4$ (unas 10 generaciones). En general, se realizaron estos

ensayos por un período de 60 generaciones. Cada 10 generaciones se tomaron muestras del cultivo y se analizó: i) contenido de DNA plasmídico mediante preparaciones de DNA total, y ii) porcentaje de células con plásmido, mediante diluciones apropiadas de las muestras y cultivo en placas con y sin presión selectiva.

La tasa experimental de pérdida del plásmido por célula y generación (L_{ex}) se calculó a partir de la ecuación:

$$L_{ex} = 1 - (P/P_0)^{1/n}$$

siendo P_0 , la frecuencia inicial de células con plásmido y P , la frecuencia de células con plásmido tras crecer el cultivo n generaciones en un medio sin presión selectiva.

11.2 Ensayos de incompatibilidad

Dos plásmidos que comparten regiones implicadas en su replicación o control, son incapaces de coexistir en la misma célula huésped. Para realizar los ensayos de incompatibilidad, se empleó el test de Tipo I, según el método descrito por Nordström *et al* (1980a, 1980b). En este tipo de test, cultivos competentes de *S.pneumoniae* que llevan el plásmido de interés (residente) se transforman con un segundo plásmido (donador), que lleva un marcador de selección distinto al del plásmido residente. Para estudiar la posible incompatibilidad ejercida por el plásmido donador sobre el residente, se selecciona siempre para el marcador del plásmido donador. Los transformantes se aislaron en placas con el antibiótico marcador del plásmido donador y se crecieron en medio líquido hasta una $DO_{650} = 0.5$. En este momento, se tomaron muestras para analizar el contenido de DNA plasmídico y para calcular el porcentaje de células resistentes al primer marcador, y que por tanto, conservarían el plásmido residente. Se ha estimado que son necesarias unas 25 generaciones para que una u.f.c. dé lugar a una colonia de tamaño medio, y que transcurren unas 12 generaciones hasta que la colonia inoculada en el medio líquido da lugar a un cultivo con una $DO_{650} = 0.5$. Por ello, en este caso se analizan los efectos del plásmido donador sobre el residente, tras 37 generaciones sin presión selectiva para éste. Cuando se deseaban conocer los efectos en generaciones posteriores, los cultivos de los transformantes iniciales se diluyeron sucesivamente en medio con presión selectiva para el plásmido

donador. Se analizó el contenido de DNA plasmídico y se determinó el porcentaje de células que conservaban el plásmido residente.

En algunas ocasiones se deseaba conocer el efecto que ejercía la presencia del plásmido residente sobre el número de copias del plásmido donador. En estos casos se empleó el test Tipo II (Nordström *et al*, 1980a, 1980b), que consiste en seleccionar los transformantes con el marcador del plásmido donador en medio sólido y en un medio líquido inicial. A partir de aquí, los cultivos se diluyen sucesivamente en medio con presión de selección para el plásmido residente o en ausencia de presión selectiva, se realiza un análisis del contenido de DNA plasmídico y se calcula el porcentaje de células que contienen el plásmido donador.

12. MARCAJE RADIOACTIVO DEL DNA

12.1 Preparación de sondas radiactivas

Las sondas del DNA se prepararon realizando el marcaje del DNA con hexanucleótidos al azar, según el método de Feinberg y Vogelstein (1983).

El DNA plasmídico (1 μ g aproximadamente) que iba a servir de DNA molde se desnaturalizó por calor (10 min, 95°C) y se enfrió rápidamente. La reacción se realizó en 20 μ l, en presencia de 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM DTE (ditioeritritol), 0.2 mg/ml BSA, 30 μ Ci de [α -³²P]dCTP (actividad específica de 5000 Ci/mmol), mezcla de los dNTPs restantes a 75 μ M, 2.2 μ g de hexanucleótidos pd(N)₅ y 1 u de Pol IK. La mezcla se incubó durante 2 h a 37°C, y la reacción se paró por adición de 20 mM EDTA y 8 μ g de DNA de timo ternera. La eliminación del nucleótido radiactivo no incorporado al DNA se hizo pasando la muestra por una columnilla de Sephadex G-50 equilibrada en TE(10:1). Las sondas se hirvieron durante 10 min, seguidas de un enfriamiento rápido antes de ser utilizadas.

12.2. Marcaje de fragmentos de DNA en 3'

Para este tipo de marcaje se emplearon fragmentos de DNA con extremos 5' protuberantes, cuyos tamaños oscilaron entre 50 y 1600 pb. La mezcla de reacción contenía 0.5-5 μ g de DNA en 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 10 mM β ME,

50-80 μCi del $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$ (actividad específica de 5000 Ci/mmol) que se deseaba incorporar y 10 u de Pol IK. Se realizó una incubación de 15 min a t.a. y se añadió una mezcla de dNTPs a 60 μM , incubándose 5 min a t.a. El DNA fue posteriormente sometido a tratamiento con fenol:cloroformo y precipitación con etanol.

12.3. Marcaje de oligonucleótidos en 5'

El marcaje de oligonucleótidos en el extremo 5' se realizó utilizando la T4 PNK, tomando como base el método descrito por Sambrook *et al* (1989). Generalmente, la mezcla de reacción contenía 1 nmol de un oligonucleótido (cuyo longitud oscilaba entre 8 y 26 nt) en 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl_2 , 10 mM βME , 50 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (actividad específica de 5000 Ci/mmol) y 10 u del enzima. Se realizó una incubación de 45 min a 37°C y se paró la reacción con 34 mM EDTA. Para la eliminación del nucleótido radiactivo no incorporado, la mezcla se trató con fenol:cloroformo y posterior precipitación con 4 M acetato amónico y 2.5 volúmenes de etanol, seguido por un lavado con etanol al 80%.

12.4. Marcaje de oligonucleótidos en 3'

El marcaje de oligonucleótidos en el extremo 3' se llevó a cabo utilizando el kit de marcaje en 3' de Amersham. La mezcla de reacción contenía 1 nmol de oligonucleótido (longitud entre 8 y 23 nt) en el tampón cacodilato: cacodilato sódico, cloruro de cobalto, DTT, pH 7.2; 50 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ddATP}$ (actividad específica de 5000 Ci/mmol) y 10 u de la transferasa terminal. Se realizó una incubación de 1 h a 37°C. En algunos casos, la eficiencia del marcaje se mejoró añadiendo 5 u más del enzima y prolongando la incubación 1 h más. La reacción se paró añadiendo 42 mM EDTA. La eliminación del nucleótido radiactivo no incorporado se realizó como en el apartado anterior.

13. TRANSFERENCIA DE DNA A FILTROS DE NITROCELULOSA

La transferencia de DNA a filtros de nitrocelulosa se basó en el método descrito por Southern (1975). Para la transferencia del DNA a partir de geles de agarosa no alcalinos, se realizó un tratamiento previo de desnaturalización: hidrolización parcial por inmersión de los geles en 0.12 M HCl durante 15 min. Después, los geles se

lavarón con agua destilada y se sumergieron 40 min en la solución Soak I (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl). Los geles se volvieron a lavar con agua destilada y se sumergieron otros 40 min en la solución de neutralización Soak II (3 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.2). Los geles alcalinos, en los cuales el DNA ya estaba desnaturalizado, se sumergieron directamente en la solución de neutralización (1 M Tris-HCl, pH 7.6, 1.5 M NaCl).

A continuación, el gel se colocó sobre papel Whatman 3MM, cuyos bordes estaban en contacto con una solución SSC(10x) [1.5 M NaCl, 0.15 M citrato trisódico]. Se colocó encima del gel un filtro de nitrocelulosa humedecido en SSC(10x), tres papeles Whatman 3MM y una pila de servilletas de papel. Se puso un peso encima para favorecer el contacto entre las distintas capas de papel y se permitió la transferencia a t.a. durante 14 h. Tras este período, el filtro se secó a 37°C y se mantuvo 2 h a 80°C. Para su hibridación, el filtro de nitrocelulosa se sumergió en un tampón que contenía 50% formamida, 5 mM EDTA, 0.9 M NaCl, 48 mM fosfato sódico, pH 6.8, 0.1% SDS, 100 µg/ml DNA de esperma de salmón (o de timo de ternera) desnaturalizado, solución Denhart's 1x (preparada según Maniatis *et al*, 1982) y la sonda de DNA marcada radiactivamente, previamente desnaturalizada por calor 10 min a 95°C. La hibridación se llevó a cabo a 37°C durante 12-14 h. Posteriormente, se lavaron los filtros con las soluciones I (50% formamida, 2 mM EDTA, 20 mM fosfato sódico, pH 6.8, 0.36 M NaCl, 0.1% SDS) y II (0.1 mM EDTA, 1 mM fosfato sódico, pH 6.8, 18 mM NaCl, 0.1% SDS). Para finalizar, se secaron los filtros a 37°C y se expusieron a una película autorradiográfica.

14. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Para la electroforesis de proteínas se prepararon geles desnaturalizantes de PAA (30% acrilamida:0.8% bisacrilamida) a concentraciones variables entre 10 y 16%, en 0.375 M Tris-HCl, 0.1% SDS, 0.06% TEMED y 0.06% PSA. Los geles se prepararon empleando las cubetas Mini-Protean de Bio-Rad. Las dimensiones de los geles fueron las descritas anteriormente. La electroforesis se realizó en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 300 mM glicina, 0.1% SDS y 2 mM EDTA, a un voltaje constante de 200 V. Las muestras se prepararon para la electroforesis añadiéndoles el tampón de carga

SLB (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1% SDS, 2 mM EDTA, 5% β ME, 10% glicerol, 0.2 mg/ml BFB) e incubándolas a 95°C durante 3 min, antes de ser cargadas en el gel.

Tras la electroforesis, los geles se tiñeron en una solución de azul brillante de Coomasie (CBB) al 0.25% en una mezcla de agua:metanol:ácido acético glacial (4:5:1) durante 40 min a t.a. El exceso de colorante se eliminó sumergiendo los geles durante 1 h en una solución de ácido acético:metanol (7.5% : 45%), pasándolos a continuación a una solución de ácido acético:metanol (7.5% : 5%) durante 14 h a t.a. En ocasiones, la tinción de los geles se realizó a 50°C. En estos casos, se utilizó una solución de CBB al 0.05% en una mezcla de agua:isopropanol:ácido acético glacial (6.5:2.5:1) durante 40 min; para desteñir los geles se usó ácido acético al 10% durante 1 h a 50°C.

15. HIPEREXPRESIÓN DE GENES BAJO EL PROMOTOR ϕ 10 DEL FAGO T7 Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Para la **hiperexpresión específica de genes clonados bajo el promotor ϕ 10 del fago T7**, se utilizó el sistema de clonaje vector pET5/huésped BL21(DE3) descrito por Studier y Moffatt (1986).

La estirpe BL21(DE3) contiene un profago defectivo del fago λ que lleva el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor inducible *lacUV5*. El vector pET5 contiene el promotor ϕ 10, el cual es reconocido específicamente por la RNA polimerasa de T7; y bajo ese promotor se clona el gen que se quiere expresar. La adición de IPTG al sistema induce el promotor *lacUV5*, activándose de esta forma la síntesis de la RNA polimerasa del fago T7. Esta enzima promueve la transcripción a partir del promotor ϕ 10, expresándose así el gen de interés. Si añadimos rifampicina (Rif) se inhibirá la RNA polimerasa del huésped, pero no la del fago, con lo cual conseguiremos una expresión específica de nuestro gen. En algunos casos, se utilizó como vector el fagémido pALTER-1, el cual también contiene el promotor ϕ 10. Con cualquiera de los dos vectores, el marcador de selección utilizado fue Ap.

La **funcionalidad del sistema**, establecido por Studier, se podría ver afectada en tres casos: 1) por la presencia de genes clonados en el vector que diesen lugar a productos tóxicos para las bacterias; 2) por pérdida del plásmido y 3) por el hecho de que la β -lactamasa codificada por el vector, en cultivos suficientemente crecidos, puede degradar cierta cantidad de Ap del medio, favoreciendo con ello, el crecimiento de células sin plásmido. Para comprobar la eficacia del sistema se determinó el porcentaje de células con plásmido y de células en las que el sistema era funcional, de la siguiente forma:

El porcentaje de células con plásmido se determinó como:

$$\frac{\text{u.f.c. en medio TY con Ap}}{\text{u.f.c. en medio TY}} \times 100$$

El porcentaje de células que carecen de sistema funcional, o sea, aquellas células que pueden crecer en presencia de IPTG, bien porque hayan perdido el plásmido o porque son mutantes que carecen de capacidad para expresar el gen clonado, se determinaron como:

$$\frac{\text{u.f.c. en TY con } 125 \mu\text{M IPTG}}{\text{u.f.c. en TY}} \times 100$$

El porcentaje de mutantes que conserven el plásmido pero sean incapaces de expresar el gen clonado, y que por tanto, crecerán en presencia de Ap y de IPTG, se determinó como:

$$\frac{\text{u.f.c. en TY con Ap e } 125 \mu\text{M IPTG}}{\text{u.f.c. en TY}} \times 100$$

Para la expresión de un determinado gen, se preparó un preinóculo de la estirpe BL21(DE3) con el plásmido recombinante de interés, en el medio M9 con Ap. Se incubó a 37°C con agitación y se permitió el crecimiento hasta una $DO_{650} = 0.3$. Seguidamente, el cultivo se diluyó 20 veces en el mismo medio y se dejó crecer hasta alcanzar una $DO_{650} = 0.45$. En este momento, se indujo el sistema por adición de 1 mM IPTG y se incubó 30 min a 37°C. Transcurrido este tiempo, se añadió Rif (200 µg/ml) al cultivo y se incubó durante 90 min más a 37°C.

Para la **expresión de proteínas totales**, se recogieron las células por centrifugación (10 min, 4°C, 8200 x g) y se resuspendieron en un tampón que contenía 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 2 mM EDTA, 1% βME, 1% glicerol. Se calentaron las muestras 3 min a 95°C y se les añadió el colorante de carga SLB. Las muestras se analizaron en un gel de SDS-PAA al 10 o 12%.

16. PRECIPITACIÓN Y VALORACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de las muestras proteicas se llevó a cabo por precipitación con acetona o TCA. En el primer caso, a la muestra se le añaden 5 volúmenes de acetona fría y se incuba 15 min a -20°C. El precipitado se recoge por centrifugación a 11200 x g durante 10 min a -15°C, se disuelve directamente en el tampón de carga SLB y se hierve durante 3 min antes de ser analizado por SDS-PAGE. La precipitación con TCA se realiza añadiendo a la muestra 0.03% Na-DOC y 10% TCA, se mantiene durante 1 h a 0°C y se recoge el precipitado por centrifugación a 9600 x g, durante 20 min a 0°C. Después, se disuelve con SDS al 5% y se añade el tampón SLB; si es necesario se ajusta el pH de la muestra con NaOH. El análisis se realiza mediante SDS-PAGE.

La concentración de proteínas de una muestra se valoró mediante el reactivo BCA (Pierce) siguiendo el protocolo estándar recomendado por la casa suministradora. Se preparó una curva patrón de seroalbúmina bovina entre 0.2 y 1.2 mg/ml.

17. PURIFICACIÓN DE RepB

La purificación de la proteína RepB se realizó, esencialmente, siguiendo el método descrito en el trabajo de la Campa *et al* (1990), con algunas modificaciones. Se preparó un preinóculo de *E.coli* BL21(DE3) con el plásmido pLS19 en 50 ml de M9 con 200 µg/ml Ap y se incubó a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una $DO_{650} = 0.3$. Se realizó una dilución 1/100 en 2 l de medio M9 con 200 µg/ml Ap, y se incubó a 37°C hasta que al cultivo alcanzó una $DO_{650} = 0.45$. En este momento se añadió 1 mM IPTG y se incubó 30 min a 37°C. Transcurrido este tiempo, se añadió Rif (200 µg/ml) y se incubó el cultivo 90 min más a 37°C. Las células se recogieron por centrifugación a 10800 x g durante 35 min, se lavaron con el tampón H (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 5% EG) suplementado con 150 mM KCl y se resuspendieron en 20 ml de ese mismo tampón. La lisis celular se llevó a cabo pasando la suspensión dos veces por una prensa French a una presión de 8.3 MPa. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación durante 30 min a 10000 x g.

Para la precipitación de los ácidos nucleicos, al sobrenadante se le añadió gota a gota una solución de sulfato de estreptomicina (Sm) al 25% (6 ml), mientras la mezcla se agitaba a 0°C. La agitación se continuó durante 30 min más a 0°C y se eliminó el precipitado por centrifugación (30 min, 4°C, 10000 x g). Al sobrenadante se le añadió, poco a poco, sulfato amónico hasta el 70% de saturación, manteniendo la mezcla a 0°C con agitación suave. Cuando la sal se hubo disuelto, se continuó la agitación durante 30 min más. La cantidad de sulfato amónico a añadir se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$g = \frac{533 \times (S_1 - S_2)}{100 - 0.3 \times S_2}$$

siendo S_1 el porcentaje de saturación inicial y S_2 el porcentaje de saturación final. Para un 70% de saturación hay que añadir 472 mg de sulfato amónico por cada ml de sobrenadante. El precipitado proteico se recogió por centrifugación (30 min, 4°C, 10000 x g), se disolvió en 15 ml del tampón H suplementado con 300 mM KCl y se dializó frente a 1 l del mismo tampón (se realizaron dos cambios del tampón, cada uno al cabo de 3 h). Se analizó el contenido de la bolsa de diálisis, separando por

centrifugación las proteínas precipitadas de las solubles en estas condiciones. Se observó que RepB se encontraba mayoritariamente en el sobrenadante, por lo cual, éste se dializó frente a 1 l del tampón H sin adición de KCl. Este paso facilita la purificación de RepB ya que esta proteína pierde solubilidad respecto a las otras, al disminuir la fuerza iónica del tampón. Tras la diálisis sin KCl, las proteínas solubles e insolubles, se separaron por centrifugación (30 min, 4°C, 10000 x g).

El sedimento se disolvió en 20 ml de tampón H con 300 mM KCl y se aplicó a una columna de heparina-agarosa (Affi-Gel de Bio-Rad), equilibrada con el mismo tampón. Se empleó una columna K-9 de Pharmacia de 0.9 cm de diámetro y 8.3 ml de volumen. Tras la aplicación de la muestra, se realizó un lavado con el tampón H suplementado con 300 mM de KCl (10 volúmenes de columna). Las proteínas adsorbidas a la matriz de heparina-agarosa se eluyeron mediante un gradiente lineal de 300 a 600 mM de KCl (120 ml), a un flujo constante de 14 ml/h. Se recogieron fracciones de 2 ml y se analizaron 100 μ l de las fracciones que eluyeron aproximadamente entre 410 y 500 mM de KCl, precipitándolas con acetona o con TCA, y cargándolas en un gel de SDS-PAA. RepB se encontró de forma mayoritaria en las fracciones centrales analizadas; fracciones que se juntaron y dializaron frente a 1 l de tampón H con 300 mM de KCl.

Como última de etapa de purificación y concentración de la proteína, las fracciones dializadas de la primera columna se aplicaron a una segunda columna de heparina-agarosa equilibrada de la misma forma que la vez anterior. Se realizó un lavado de 10 volúmenes de columna con el tampón de equilibrado y, posteriormente, RepB se eluyó con un gradiente lineal de 0.3 a 1 M KCl (50 ml), a un flujo constante de 14 ml/h y recogiendo fracciones de 2 ml. Se procedió al análisis de 50 μ l de las fracciones, precipitándolas con TCA antes de ser cargadas en un gel de SDS-PAA y se juntaron las tres fracciones centrales que eluyeron aproximadamente a 425 mM de KCl, caracterizadas por una mayor pureza y concentración en RepB. El volumen se repartió en alícuotas de 50 μ l y se congeló a -70°C para su conservación.

18. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE RepB Y CÁLCULO DE SU COEFICIENTE DE EXTINCIÓN

La concentración proteica en la preparación de RepB fue determinada por el servicio de Química de Proteínas del CIB mediante el análisis de la composición molar de aminoácidos (aa). Para ello, se dializaron 950 μl ($\sim 40 \mu\text{g}$) de la muestra frente a 1 l de agua destilada, antes de proceder a su liofilización. Se realizó una hidrólisis en presencia de 6 N HCl y 5% ácido tioglicólico, y se inyectó una cuarta parte de la muestra, en el analizador automático de aa. Los aminoácidos se analizaron mediante un equipo Biotronik LC-7000. Para RepB se calculó una concentración de 45 ng/ μl .

La determinación del coeficiente de extinción molar teórico de RepB se realizó a partir de los valores de los aa: triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe), presentes en la proteína, multiplicados por el coeficiente de extinción (ϵ) a 280 nm de cada aa. RepB posee 1 Trp, 12 Tyr y 7 Phe; y su masa molecular deducida a partir de su secuencia es de 24252 Da. Los coeficientes de extinción a 280 (ϵ_{280}) calculados para cada uno de los aa son los siguientes: 5559 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para Trp, 1197 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para Tyr, y 700 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para Phe. Por tanto, el valor de ϵ_{280} para RepB se calculó de la siguiente forma:

$$\epsilon_{280} = \frac{(1 \times 5559 + 12 \times 1197 + 7 \times 700) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}}{24252 \text{ Da}} = \frac{24823 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}}{24252 \text{ g mol}^{-1}}$$

$$\epsilon_{280} = 1,0235 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$$

Se realizó una medida de la absorbancia de RepB a una longitud de onda $\lambda = 280$ nm frente al tampón H suplementado con 425 mM de KCl; para ello, se utilizó un espectofotómetro Shimadzu, modelo UV-160. El valor de absorbancia obtenido fue de 0,179.

19. ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE RepB

19.1. Ensayos de actividad de RepB sobre DNA superenrollado

En general, para este tipo de ensayos se incubaron 45 ng de proteína con 700 ng de DNA plasmídico en un volumen de 30 μ l de tampón B (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM KCl, 5 mM DTT) suplementado con 20 mM $MnCl_2$, durante 30 min a las temperaturas de 37, 45 y 60°C. La reacción se paró con la adición de 125 μ g/ml proteinasa K e incubación de 10 min a t.a. A las muestras se les añadió el colorante de carga BXGE y se mantuvieron a 4°C, antes de ser analizadas mediante electroforesis en geles 1% agarosa en TBE, con 0.5 μ g/ml de EtBr. La electroforesis se llevó a cabo a 2.7 V/cm. Los geles se fotografiaron bajo luz UV (254 nm) y se realizaron densitometrías de los negativos.

Para determinar las mejores condiciones de actividad de RepB se realizaron ensayos variando las concentraciones de proteína y DNA, los tiempos y temperaturas de incubación, la concentración de $MnCl_2$ añadida a la mezcla de reacción, la presencia o no de otras proteínas, presencia de la heparina como competidor, etc. Asimismo, se probaron distintas condiciones para el análisis de los productos de reacción: porcentaje de agarosa, concentración de EtBr y presencia o no de éste durante la corrida del gel, tampón para la electroforesis y duración de ésta, etc. Todas estas variaciones serán explicadas en el apartado de Resultados.

RepB posee una actividad de corte/cierre tipo topoisomerasa I; por tanto, la reacción de RepB sobre DNA superenrollado circular covalentemente cerrado (CCC o FI) tendrá como productos de la actividad de corte, las formas circulares abiertas (OC o FII); y como productos de corte/cierre, las formas circulares relajadas (RC o FI'). Como estas tres formas de DNA plasmídico poseen intensidades de fluorescencia diferentes, debido a que el EtBr se intercala de distinta manera entre ellas, el rendimiento de los productos de corte/cierre de RepB se calculó por disminución de la señal de fluorescencia de las formas FI del DNA no tratado con RepB. También se observó que el KCl presente en el tampón de incubación, puede generar inespecíficamente formas FII en una pequeña proporción. Por ello, se calculó este porcentaje en la muestra no tratada y se descontó en los cálculos realizados para las muestras incubadas con RepB. La fluorescencia se cuantificó a partir de los negativos

obtenidos en un densitómetro 400, utilizando el programa ImageQuant (Molecular Dynamics) o directamente a partir de los geles teñidos, usando el aparato Gel-Doc 1000 de Bio-Rad (Molecular Analyst).

19.2. Ensayos de actividad de RepB sobre oligonucleótidos

Para este tipo de ensayos se utilizaron oligonucleótidos marcados en su extremo 5' con ^{32}P , que fueron incubados con la proteína, en una relación molar oligo:proteína de 1:7.5, en el tampón B suplementado con 20 mM MnCl_2 . Las mezclas de reacción se incubaron 30 min a las temperaturas de 37, 45 y 60°C. El transcurso de la reacción se paró con la adición de 200 mM EDTA o 300 $\mu\text{g/ml}$ proteinasa K, con una incubación en este último caso de 20 min a 37°C. A continuación, se realizó una precipitación de las muestras añadiendo 5 μg de tRNA como coprecipitador, 0.1 volúmenes de 3 M acetato sódico, pH 7.0 y 3 volúmenes de etanol absoluto. Se mantuvieron 1 h a -70°C y se recogió el precipitado por centrifugación (40 min, -10°C, 9500 x g). Las muestras se disolvieron directamente en el colorante de carga BFX y fueron analizadas en un gel de secuenciación del 20% PAA/8 M urea. Se detectó la radiactividad por exposición autorradiográfica y se cuantificaron las bandas con el programa ImageQuant del sistema PhosphorImager (Molecular Dynamics).

Para detectar los productos de la actividad de corte/cierre de RepB sobre oligonucleótidos monocatenarios, se mezclaron oligos marcados (1.3 pmol) con oligos no marcados (2.5 pmol) de distinta longitud, y se incubaron con distintas concentraciones de RepB (1.2 o 2.3 pmol) en el tampón B suplementado con 20 mM MnCl_2 , durante 30 min a las temperaturas ya indicadas. Las muestras se trataron y analizaron de la misma forma que en el apartado anterior.

20. AISLAMIENTO DE COMPLEJOS PROTEÍNA-DNA COVALENTES

Para intentar aislar o detectar intermediarios covalentes RepB-DNA, se realizaron cuatro tipos de ensayos:

a) Interfase. Se basa en la captura de complejos covalentes proteína-DNA (formas FII) por la interfase agua-fenol y en la detección de éstos como bandas retardadas en

un gel tras la digestión con un enzima de restricción (Pansegrau *et al*, 1990). En estos ensayos el DNA plasmídico se incubó con RepB en las condiciones indicadas en el apartado anterior. A continuación, se añadió SDS (2.5% concentración final) y se incubó durante 5 min a 37°C. La muestra se sometió a un tratamiento con fenol:cloroformo. Se separaron las fases acuosa y fenólica por centrifugación, recogiendo tanto la fase superior como la interfase. La interfase se dializó frente a 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 250 mM KCl y, al igual que la fase superior, fue precipitada con etanol. El sedimento se disolvió en el tampón adecuado para la digestión con un enzima de restricción, y parte de la muestra fue digerida. Todos los productos se analizaron por electroforesis, en un gel de agarosa al 0.8% con 0.5 µg/ml de EtBr y tampón TBE.

b) K⁺-SDS. Se realizó siguiendo fundamentalmente las indicaciones de Waters *et al* (1991). Se basa en la precipitación de complejos SDS-proteína y complejos SDS-proteína unidos covalentemente a DNA o RNA mediada por iones K⁺. Para realizar estos ensayos el DNA plasmídico se incubó con RepB en las condiciones ya indicadas. Tras los 30 min de incubación, las muestras fueron tratadas con 1% SDS en presencia de 10 mM EDTA, durante 10 min a t.a. Se añadió KCl (100 mM concentración final) y se realizó una incubación de 20 min a 0°C. Las muestras se centrifugaron 10 min, a 9500 x g y 4°C, y se recogió tanto el precipitado como el sobrenadante. Los precipitados se resuspendieron en el mismo volumen de los sobrenadantes y una parte se trató con proteinasa K (1 µg/µl). Los productos de reacción se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.9%, con 0.5 µg/ml de EtBr y tampón TBE.

c) Retardo en gel de fragmentos de restricción. Este método ha sido descrito por Koepsel *et al* (1985) y consiste en someter las mezclas de reacción a un tratamiento con proteinasa K y SDS, digerirlas con un enzima de restricción y observar los intermedios covalentes como bandas retardadas en un gel. El DNA plasmídico se incubó con la proteína como siempre, tras lo cual una parte de las muestras se dializó frente al tampón del enzima de restricción que se iba a usar y otra parte, se precipitó con etanol. Las muestras precipitadas con etanol se dividieron en tres grupos: el primer grupo se trató directamente con el enzima de restricción. Los otros dos grupos se trataron primeramente con proteinasa K (12.5 µg/ml) y SDS (0.28%) durante 10 min a t.a., o con proteinasa K (125 µg/ml) y SDS (0.28%) durante 30 min a 0°C.

Después se realizó una extracción con fenol y una precipitación con etanol, y por último, se trató con el enzima de restricción. Todas las muestras se analizaron por electroforesis en un gel de PAA al 5% en TAE, en condiciones no desnaturalizantes.

d) Retardo en gel de complejos con oligonucleótidos. Este método se basa, como en el caso anterior, en la visualización de los complejos proteína-DNA covalentes como una banda de migración electroforética retardada, según el trabajo de Pansegrau *et al* (1993). Para realizar este ensayo se mezclaron 3.75 pmol de un oligonucleótido marcado en su extremo 3' con distintas concentraciones de RepB (5.5, 14 y 28 pmol) en 90 μ l del tampón B suplementado con 20 mM $MnCl_2$. La mezcla se incubó durante 30 min a 37, 45 o 60°C. A continuación, se trató con proteinasa K (215 mg/ml) durante 20 min a 37°C. Los productos de reacción se precipitaron con etanol y se analizaron en un gel de secuenciación del 20% PAA/8 M urea. Las bandas se visualizaron mediante una exposición autorradiográfica.

21. ANÁLISIS DE LA QUIRALIDAD DEL FOSFATO IMPLICADO EN LA UNIÓN DE LA PROTEÍNA RepB AL DNA

El análisis de la estereoquímica del fosfato implicado en la transferencia del DNA a la proteína, requiere un fosfato quiral entre los nt donde se va a producir el corte en el DNA y un fosfato interno marcado radiactivamente con ^{32}P situado en el nt situado a 5' del corte, que nos va a permitir visualizar los productos obtenidos tras la reacción de transferencia y el análisis con nucleasas estereoespecíficas. El fosfato quiral se consigue substituyendo uno de los oxígenos, que no forman parte del enlace fosfodiéster, por un átomo de azufre. Como ya hemos comentado anteriormente, estos oligonucleótidos tio-derivados fueron sintetizados y purificados por el Dr. Ramón Eritja en el European Molecular Biology Laboratory, según las condiciones descritas por Mizuuchi y Adzuma (1991).

La construcción de un oligonucleótido con la secuencia de corte de la proteína RepB y que llevase el fosfato quiral en la posición del fosfato implicado en la unión a la proteína, se realizó de dos formas:

a) Ligación de los oligonucleótidos tio-derivados de 9-mer marcados (configuraciones R_p y S_p : 5'-Gp^sApCpCpCpCpCpCpC_{OH}-3', donde p^s representa el fosfato quiral situado entre los nt G/A donde se produce el corte) y del oligonucleótido de 15-mer (5'-TpGpGpGpGpGpGpGpCpTpApCpTpApC-3', que contiene la secuencia consenso de RepB situada a 5' del sitio de corte) con la T4 RNA ligasa. Previamente, los tio-derivados fueron marcados en sus extremos 5' con la T4 PNK y [α -³²P]dATP y se les bloqueó el grupo -OH en 3' usando ddATP y la transferasa terminal, obteniéndose como resultado el oligonucleótido 5'-p*Gp^sApCpCpCpCpCpCpCpA_H-3', con cada uno de los tioderivados (donde p* indica el fosfato marcado radiactivamente). La reacción de ligación usando la T4 RNA ligasa se realizó siguiendo las recomendaciones de Brennan *et al* (1983): concentraciones de oligonucleótidos y enzima más altas que las que se usan normalmente para unir moléculas de RNA, exceso del aceptor-OH de 1 a 10 veces (molar) respecto al donador-P, tiempos de reacción más largos (1-10 días), incubación a baja temperatura (5-15°C), concentraciones de ATP a valores bajos (de 0.1 a 0.9 respecto al donador) y presencia de Mn(II). Para realizar la ligación se preparó una mezcla con 300 pmol de oligonucleótido tio-derivado marcado en su extremo 5' (donador-P, 30 μ M de concentración final), 1.2 nmol del oligonucleótido 15-mer (aceptor-OH, 120 μ M de concentración final), 0.15 nmol de ATP (15 μ M), 1 mM fosfocreatina pH 9.0 y 2 mM espermina pH 7.9; esta mezcla se llevó a sequedad en una bomba de vacío y luego se añadieron los siguientes componentes: 50 mM HEPES-NaOH pH, 7.9, 10 μ g/ml BSA, 20 mM DTT, 175 u/ml de creatina-fosfato-quinasa, 170 u/ml de adenilatoquinasa, 10 mM MnCl₂ y 50 u de T4 RNA ligasa, en un volumen final de 10 μ l. Las muestras se analizaron en un gel 24% PAA/50% urea. Otras condiciones para realizar una ligación de oligonucleótidos con la T4 RNA ligasa se describen en Tessier *et al* (1986): se usa una relación aceptor:donador de 5:1, 20 μ M ATP, 10 mM MgCl₂, 1 mM HCC (cloruro de hexamin-cobalto), 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 μ g/ml BSA y 25% PEG. En este caso la reacción se incubó durante 16 h a 25°C y no se necesita un sistema para la regeneración de ATP.

b) Ligación de los oligonucleótidos tio-derivados de 9-mer fosforilados (configuraciones R_p y S_p : 5'-pGp^sApCpCpCpCpCpCpA_{OH}-3') y del oligonucleótido de 14-mer (5'-TpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpApC_{OH}-3', que contiene la secuencia consenso de RepB situada a 5' del sitio de corte) con la T4 DNA ligasa. Para realizar

esta ligación, los oligonucleótidos se anillaron previamente a DNA desnaturalizado del plásmido pFX2 (que contiene la secuencia de corte de la proteína RepB). La desnaturalización del DNA de pFX2 (15 pmol, 35 μ g) se realizó mediante un tratamiento con 0.4 M NaOH, y se precipitó con 0.45 M acetato sódico y 3 volúmenes de etanol. El sedimento se disolvió directamente en la mezcla de anillamiento, que contenía el oligo quiral fosforilado (30 pmol) y el oligo de 14-mer (15 pmol) en la solución SSC y 10 mM Tris-HCl pH 8.0. Para hibridar los oligonucleótidos al DNA molde se calentaron las mezclas de anillamiento (volumen final de 50 μ l) durante 5 min a 70°C, tras lo cual se dejaron enfriar lentamente hasta alcanzar la t.a. A la mezcla se le añadió la T4 DNA ligasa (6 u) en el tampón recomendado por la casa suministradora (volumen final de 70 μ l) y se incubó durante 16 h a 16°C; se añadió más ligasa y se incubó 2 h más a 16°C. Se realizó una extracción con fenol:cloroformo y una precipitación con etanol; como producto de ligación se obtendría, de forma mayoritaria, el oligonucleótido de 23-mer (5'-TpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpApCpGp⁵ApCpCpCpCpCpCpA_{OH}-3'), que contiene la secuencia de corte completa. Por otro lado, se sintetizó el oligonucleótido de 24-mer (5'-ApApGpCpGpApApTpTpTpTpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpApC_{OH}-3'), se anilló al DNA de pFX2 desnaturalizado de la misma forma que la vez anterior y mediante la T7 DNA polimerasa se incorporó [α -³²P]dGTP en su extremo 3', obteniéndose como resultado un oligo de 25-mer con el nt G del sitio de corte marcado radiactivamente. La polimerización se realizó añadiendo [α -³²P]dGTP (20 pmol, 60 μ Ci), dGTP (40 pmol) y T7 DNA polimerasa (11.5 u) en 5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 7.6 y 5 mM DTT, en un volumen final de 70 μ l; se incubó 15 min a t.a. y se añadió más enzima, incubando otros 15 min más a t.a.; la reacción se paró con 25 mM EDTA en hielo. La comprobación de la eficiencia de polimerización se realizó tomando una alícuota de 0.5 μ l que se mezcló con 2.5 μ l de agua y se repartió en dos filtros Whatman DE81; uno de los filtros se dejó secar a t.a. (cpm total) y el otro filtro se lavó seis veces con 0.5 M HPO₄Na₂ durante 5 min y 2 veces con agua destilada 1 min (cpm incorporadas), se secó a 80°C y se contaron las cpm de los dos filtros en un contador de centelleo. La incubación del oligo quiral de 23-mer y del oligonucleótido de 25-mer marcado radiactivamente con la proteína RepB en condiciones de corte/cierre que permitan el intercambio de hebras nos dará como producto un oligonucleótido quiral de 33-mer con un fosfato interno (5'-ApApGpCpGpApApTpTpTpTpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpApCp*Gp⁵ApCpCpCpCpCpCpA_{OH}-3'). La

eliminación del DNA molde de pFX2 se llevó a cabo pasando las muestras, previamente diluidas y desnaturalizadas por calor (10 min a 95°C) por un microconcentrador Microcon 100 (de Amicon), durante 15 min a 500 x g y 20°C. El corte de membrana de este microconcentrador es de 100 KDa, con lo cual el DNA era retenido y los oligos o nt no incorporados se recuperaban en el filtrado. Este filtrado se pasaba nuevamente por otro microconcentrador Microcon 3 (de Amicon, corte de membrana de 3 KDa), durante 1 h a 14000 x g y 20°C, para la eliminación del nt no incorporado y del oligo quiral (9-mer) no anillado.

Una vez obtenido el oligonucleótido quiral sustrato se realizó una incubación con dos concentraciones de RepB (0.6 y 1.9 pmol), durante 20 min a 45°C. Las muestras se trataron con proteinasa K (125 µg/ml) durante 10 min a t.a. y se precipitaron con etanol; se analizaron en un gel 20% PAA/8 M urea y se eluyó la banda de PAA correspondiente al producto de la actividad de corte/cierre de RepB. El análisis de la quiralidad del fosfato del oligonucleótido eluído se realizó mediante digestiones con dos nucleasas esteroespecíficas: la nucleasa P1, que reconoce el enlace R_p -fosforotio y la PDE, que actúa preferentemente sobre el enlace S_p -fosforotio. La reacción con la nucleasa P1 se llevó a cabo con 0.0015 u del enzima en 20 mM acetato sódico pH 5.3, 0.1 mM $ZnCl_2$ y 11.7% glicerol, y una incubación a 37°C. La reacción con la PDE se realizó con 0.15 u del enzima en 50 mM Tris-HCl pH 9.0, 5 mM $MgCl_2$ y 11.7% glicerol, e incubando a t.a. (28°C). En ambos casos se tomaron alícuotas (7.5 µl) a los 5 y 60 min de incubación, se les añadió un volumen de una mezcla de tampón BXF:agua (1:1) y se evaporaron a vacío hasta un volumen final de 7.5 µl. Los productos de reacción se analizaron en un gel 24% PAA/8.3 M (50%) urea.

22. ENSAYOS DE RETARDO EN GEL

Este tipo de ensayos se realizaron para analizar curvaturas intrínsecas en el DNA o inducidas por la unión de una proteína (y mutantes de ésta) a determinadas zonas del DNA. En este trabajo se realizaron dos tipos de ensayos:

22.1. Curvaturas intrínsecas: ensayos en ausencia de RepB

El fragmento de DNA objeto de estudio (fragmento *BanI-ApaI* de 393 pb de pMV158) se clonó en el sitio único *SalI* del vector pBend2 (Kim *et al*, 1989). El plásmido recombinante pBend-*dso* fue digerido con distintas enzimas de restricción, originando fragmentos de la misma longitud con la zona del DNA a estudiar localizada en distintas posiciones. Aquellos fragmentos que presenten una curvatura en su zona central migrarán más lentamente que aquellos que posean la curvatura en un extremo. Las diferencias en la migración de los fragmentos se verá favorecida si la electroforesis se realiza a 5°C. Por el contrario, en una electroforesis realizada a 50°C, los fragmentos curvados tenderán a migrar igual que aquellos que no lo están (Poljak y Gralla, 1987). Tras la digestión de pBend-*dso* (0.4 µg) con distintas enzimas de restricción, la muestra se repartió en dos (0.2 µg), se añadió el colorante de carga BXGE y se analizó por electroforesis en dos geles nativos 6% PAA, a un voltaje de 20 V/cm en tampón TAE. Una de las electroforesis se realizó en una cámara fría (5°C) y la otra se llevó a cabo en un incubador a 50°C. Se midieron las movilidades relativas (R_f) de cada fragmento a 5 y 50°C.

22.2. Curvaturas inducidas: ensayos en presencia de RepB

Este tipo de ensayos han sido descrito previamente en los trabajos de Garner y Revzin (1981) y de Fried y Crothers (1981). El plásmido pBend-*dso* (0.4 µg) fue nuevamente digerido con enzimas de restricción y la muestra se dividió en dos (0.2 µg) para ser tratado o no con la proteína RepB (~110 ng) en el tampón B. Las mezclas se incubaron 30 min a t.a. y se analizaron por electroforesis en un gel de PAA al 6%, a 16 V/cm en tampón TAE. Alternativamente, se emplearon geles de 0.5% agarosa-1.8% PAA, a 6 V/cm en tampón TAE. En este último caso, se incluyó una muestra a la que se trató con heparina (0.2 µg/µl), añadiéndola en los últimos 10 min de incubación.

22.3. Complejos RepB-DNA

Se utilizaron fragmentos de DNA eluidos a partir de un gel de PAA que fueron marcados en su extremo 3'. Se incubaron con distintas cantidades de proteína durante 30 min a t.a., y se analizaron en un gel de PAA al 5%, a 25 V/cm en tampón TAE. Las bandas se visualizaron por autorradiografía.

23. ENSAYOS DE UNIÓN PROTEÍNA-DNA EN FILTRO

Los ensayos de unión de complejos RepB-DNA a filtros (de la Campa *et al*; 1990) se realizaron para conocer la naturaleza de éstos. Para estos ensayos, se mezclaron 3.75 pmol de un oligonucleótido marcado en su extremo 3' (que contenía el sitio de corte de RepB) con 23 pmol de RepB en 90 µl de tampón B suplementado con 20 mM MnCl₂. La mezcla se incubó 5 min a 60°C y se paró la reacción con 900 µl de tampón L frío (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 20 mM KCl, 5 mM DTT) suplementado con 50 mM EDTA. Las mezclas de reacción se aplicaron sobre filtros de nitrocelulosa (HA 0.45 µm, Millipore) pre-lavados con el tampón L y con un exceso de 10 veces de un oligonucleótido inespecífico. El flujo se ajustó a 1.5 ml/h. Después, los filtros se lavaron con 9 ml del tampón L y se secaron a 50°C durante 45 min. La radiactividad retenida en los filtros se determinó en un contador de centelleo (Cerenkov).

Para analizar la estabilidad de los complejos RepB-DNA, los filtros se lavaron con tampones L preparados a diferentes pH (entre 7.0 y 9.5), o suplementados con distintas cantidades de KCl (0.02, 0.5 y 1 M), NaCl (0.02, 0.5, 1 y 1.5 M) o SDS (0, 0.5, 1 y 1.5%). Se calculó el porcentaje de radiactividad retenida en los filtros, tomando como valor 100 las cpm retenidas en el filtro lavado con el tampón L básico (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 20 mM KCl, 5 mM DTT).

24. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE RepB MEDIANTE EQUILIBRIO DE SEDIMENTACIÓN

La masa molecular de la proteína RepB se determinó mediante la técnica de equilibrio de sedimentación. Previamente, la proteína RepB se dializó frente a 1 l del tampón C (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 200 mM KCl), con objeto de eliminar de la muestra el DTT y EG, que podrían interferir en las medidas de absorbancia.

Los experimentos de ultracentrifugación analítica fueron ejecutados por el Dr. Germán Rivas en el CIB. Para ello, muestras de RepB (0.02 y 0.04 µg/ml) equilibradas en tampón C fueron centrifugadas a 25000 rpm y 10°C en una

ultracentrífuga analítica modelo XL-A (Beckman Instruments Inc.) equipada con un sistema de absorción VIS-UV, empleando células con piezas centrales de epon-charcoal, de doble sector y 12 mm. Después de 8 horas se midió la distribución de absorbancia (230 y 280 nm) con la distancia radial, en intervalos de dos horas, tomándose cuatro promedios por punto y con una densidad de barrido de 0.001 cm. El cálculo de la masa molecular (M_r) de RepB se realizó ajustando la expresión (I) a los datos experimentales, empleando los programas EQASSOC y XLAEQ (suministrados por Beckman Instruments Inc.; Minton, 1994):

$$A_r = A_0 \exp[M_r (1 - v \rho) \omega^2 (r^2 - r_0^2) / 2RT] \quad (I)$$

donde A_r es la absorbancia correspondiente a una distancia radial r , A_0 es la absorbancia a una posición de referencia, v es el volumen específico parcial de RepB, ω es la velocidad angular del rotor, R es la constante de los gases, y T la temperatura absoluta. El volumen específico parcial de RepB, calculado a partir de la composición de aa de la proteína (Laue *et al*, 1992), fue de 0.749 ml/g.

25. ANÁLISIS POR ORDENADOR

Las comparaciones de secuencias de DNA, mapas de restricción, predicciones en general sobre tamaños de fragmentos, etc., así como las predicciones de curvaturas en DNA se realizaron con los programas DNASTAR. Los alineamientos más complejos de secuencias de DNA y proteínas se realizaron con los programas GCG de la Universidad de Wisconsin. La temperatura de fusión de los oligos se calculó con el programa OLIGO (versión 3.4) y los ajustes matemáticos para el cálculo de la masa molecular de RepB, se realizaron con los programas EQASSOC y XLAEQ.

RESULTADOS

1. DEFINICIÓN DEL ORIGEN MÍNIMO DE REPLICACIÓN DE LA HEBRA LÍDER DE pLS1

El origen funcional de un plásmido se puede definir como el segmento de menor tamaño requerido en *cis* para que se inicie la replicación de la hebra líder. Como pLS1 puede replicar en extractos libres de células preparados a partir de *E.coli* (del Solar *et al*, 1987a), se pudo determinar *in vitro* que el sitio de iniciación de la replicación se localiza en el fragmento *HinfI* D (Fig. 10), situado entre las coordenadas 242 y 685 de pLS1 (Puyet *et al*, 1988). Dentro de este fragmento se encuentran dos estructuras tipo tallo-lazo [Horquillas I (H-I) y II], las tres repeticiones directas (iterones I1-I2-I3), el promotor P_{cr} para la transcripción de los genes *copG* y *repB* y el codón de iniciación para la proteína CopG. Anteriormente, se había determinado que la proteína RepB purificada se une, *in vitro*, a los tres iterones de 11 pb y que realiza un corte en el DNA plasmídico a 84 pb a la izquierda del primer nucleótido del iterón I1, entre los nt G (448) y A (449) de la secuencia 5'-TACTACGA-3' situada en el lazo de H-I (de la Campa *et al*, 1990; Fig. 8).

Basándonos en estos datos anteriores, pensamos que, *in vitro*, el elemento mínimo en *cis* de pLS1 capaz de actuar como *dso* debería estar comprendido entre las coordenadas 431 (extremo 5' de H-I) y 565 (último nt del iterón I3; Fig. 8). Consecuentemente, decidimos delimitar el origen mínimo de replicación de la hebra líder de pLS1. Para ello, se hizo uso de derivados plasmídicos delecionados en esta región, concretamente los plásmidos que tienen las deleciones denominadas $\Delta 24$ y $\Delta A4$. Ambas deleciones limitarían el *dso* a las secuencias comprendidas entre las coordenadas 401 y 649, ya que los plásmidos pLS1 $\Delta 24cop7$ y pLS $\Delta A4$ muestran las deleciones más cercanas a izquierda y derecha del *dso*, respectivamente (Fig. 11). El plásmido pLS1 $\Delta 24cop7$ (Puyet *et al*, 1988) se construyó a partir de la digestión de DNA de pLS1*cop7* linearizado en el sitio *BanI* con la nucleasa BAL31 y posee una deleción de 569 pb (Δmal ; Fig. 7) situada entre las coordenadas 4240 y 401, siendo la deleción que más se aproxima al sitio de corte de la proteína RepB. Por otro lado, el plásmido pLS1 $\Delta A4$ (del Solar y Espinosa, 1992) se construyó por digestión con

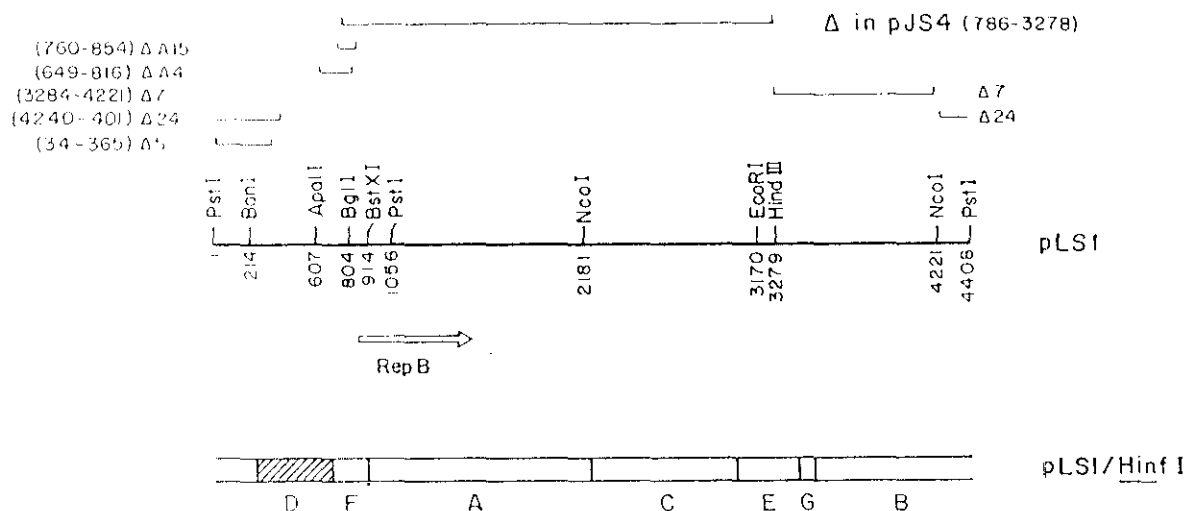


Figura 10. Mapa de delección de pLS1. Las líneas situadas sobre el mapa de restricción indican las regiones delecionadas (coordenadas entre paréntesis) en los derivados de pLS1. Las delecciones indicadas como ΔA15, ΔA4, Δ7, Δ24 y Δ5, corresponden a los plásmidos pLS1ΔA15, pLS1ΔA4, pLS4, pLS1Δ24cop7 y pLS5. Se muestran algunos sitios de restricción y sus coordenadas de corte en pLS1. Se indica mediante una flecha, la posición de la secuencia codificante para RepB. En la parte inferior se muestra el mapa de pLS1 para el enzima *HinfI*: el fragmento D (sombreado) contiene la región de iniciación de la replicación, como se demostró mediante ensayos *in vitro* realizados con extractos libres de células (Puyet *et al*, 1988).

BAL31 del DNA de pLS1 linearizado en el sitio *BglI*. Su delección de 167 pb ($\Delta copG$) es la más cercana al iterón I3 de pLS1 y se encuentra entre las coordenadas 649 y 816 (Fig. 11). Con el fin de definir *in vivo* el origen funcional de pLS1 que estaría delimitado a derecha e izquierda por las dos delecciones mencionadas, se construyó el plásmido pLS1ΔA4-24 a partir de un intercambio de fragmentos *ApaI*-*SspI* entre pLS1Δ24cop7 y pLS1ΔA4. Así se podría delimitar el *dso* funcional incluyéndolo en una región de 247 pb. Se realizó una digestión doble de ambos plásmidos (3 μ g de DNA) y, a partir de un gel de agarosa, se purificó el fragmento *ApaI*-*SspI* grande del pLS1Δ24cop7 (3123 pb) y el fragmento pequeño de pLS1ΔA4 (549 pb). Ambos fragmentos se mezclaron en una proporción 1:1 en moléculas y la ligación se realizó con la T4 DNA ligasa en presencia de 66 mM Tris-HCl, 0.05 mM ATP, 1 mM espermidina, 10 mM MgCl₂, 14 mM DTT, 0.2 μ g/ μ l BSA, en un volumen final de 30 μ l, durante 16 h a 14°C. Se usó un tercio de la mezcla de ligación para transformar *S.pneumoniae* 708, obteniéndose 3.8×10^3 transformantes por ml. Todos los

transformantes analizados por mapeo de restricción presentaban las deleciones $\Delta A4$ y $\Delta 24$. Se eligió un clon entre ellos y se procedió a determinar el número de copias y la estabilidad del plásmido pLS1 $\Delta A4$ -24.

Para la determinación del número de copias, se realizaron preparaciones de DNA total a partir de cultivos de *S.pneumoniae* que contenían pLS1 $\Delta A4$ -24, pLS1, pLS1*cop7*, pLS5 o pLS1 $\Delta 24$ *cop7*, y se analizaron en geles de agarosa. El número de copias de pLS1 $\Delta A4$ -24 se calculó por comparación del número de copias de pLS1 (22

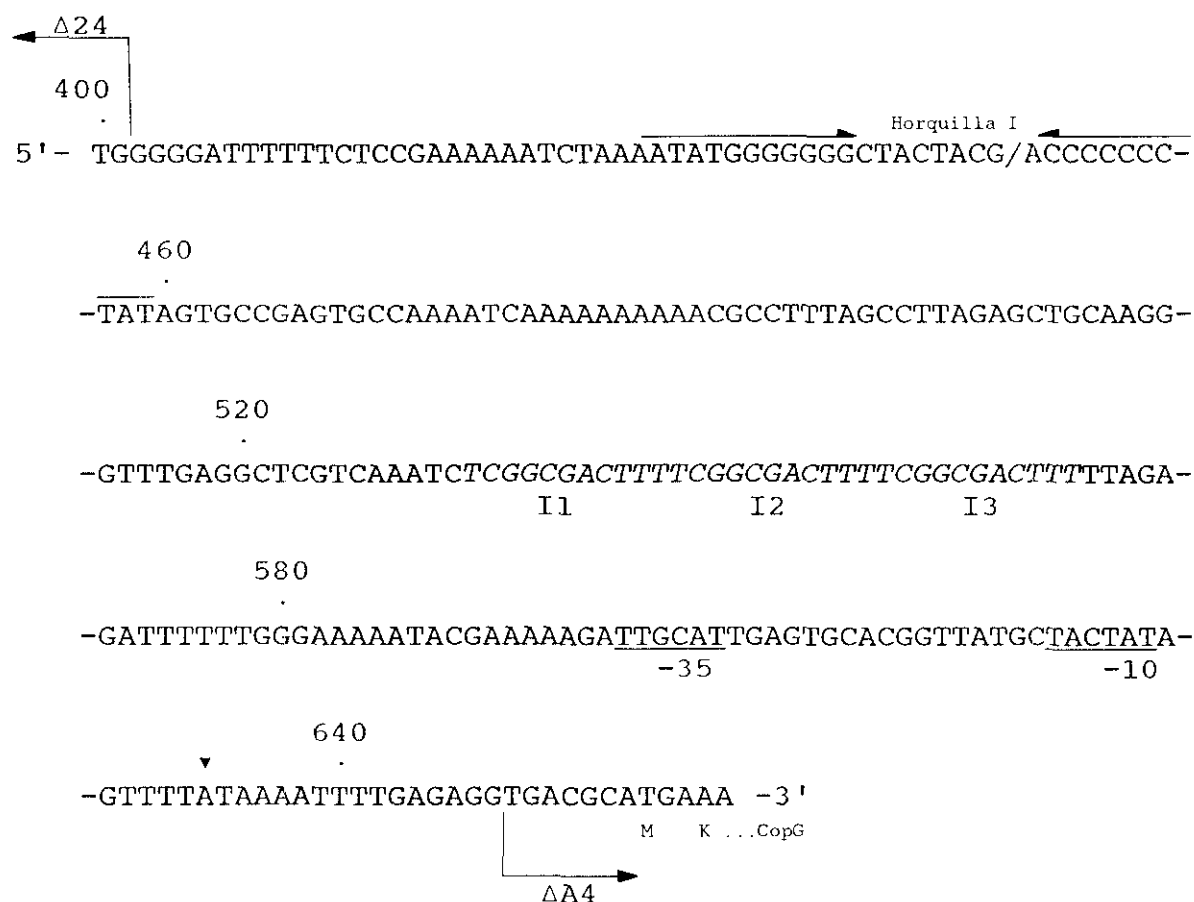


Figura 11. Secuencia de nucleótidos del origen funcional (*dso*) de pLS1. Se muestran los bordes a la derecha e izquierda de las deleciones $\Delta 24$ y $\Delta A4$. Se indican la Horquilla I (coordenadas 431-460) que contiene el sitio de corte (/) de la proteína RepB, las tres repeticiones directas (iterones I1-I3, en *itálica*), el promotor *cop-rep* (cajas -35 y -10, subrayadas en el texto), el punto de iniciación del mRNA *cop-rep* (▼) y los dos primeros codones del gen *copG*.

copias) y pLS1*cop7* (110 copias), que ya habían sido calculados previamente. Los resultados mostraron que el plásmido pLS1ΔA4-24 presenta un número de copias similar al de pLS1Δ24*cop7*, aproximadamente 70 copias (Fig. 12A).

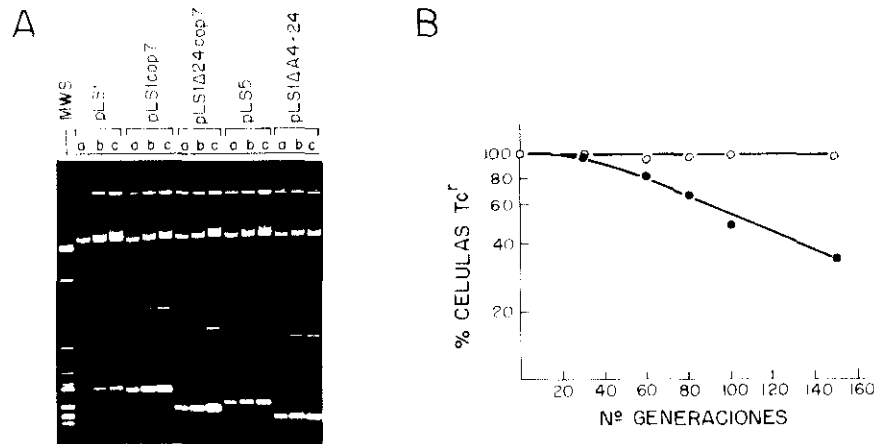


Figura 12. Fenotipos de pLS1 y algunos de sus derivados. **A.** Comparación del número de copias de los plásmidos pLS1, pLS1*cop7*, pLS1Δ24*cop7*, pLS5 y pLS1ΔA4-24 en *S.pneumoniae*. Se analizó el contenido de DNA total de los cultivos crecidos a una $DO_{650} = 0.5$. En un gel de agarosa al 1.2% se cargaron tres cantidades [5 (a), 10 (b) y 15 μl (c)] distintas de cada preparación y los cálculos se realizaron mediante densitometrías de los negativos obtenidos. **B.** Estabilidad segregacional de los plásmidos pLS1 (○) y pLS1ΔA4-24 (●) en *S.pneumoniae*. Los cultivos de esta estirpe conteniendo los plásmidos se crecieron, en medio líquido sin antibiótico, durante las generaciones indicadas. Mediante recuento en placa se calcularon los porcentajes de células Tc^r y se representaron en función del número de generaciones en ausencia de presión selectiva.

Por otra parte, interesaba determinar si pLS1ΔA4-24 era segregacionalmente estable, es decir, si las delecciones afectaban a la herencia estable del plásmido. Para analizar la estabilidad de pLS1ΔA4-24 en *S.pneumoniae*, se realizaron diluciones sucesivas sin presión de selección a partir de un cultivo inicial ($DO_{650} = 0.5$) considerado como generación $g=0$ y que fue crecido en presencia de Tc. Cada 10 generaciones se analizó el porcentaje de células Tc^r (células con plásmido) mediante recuentos en placas con o sin medio selectivo. El plásmido pLS1ΔA4-24 resultó ser bastante estable tras 60 generaciones sin presión selectiva (82% de Tc^r; Fig. 12B). Sin embargo, al cabo de 100 generaciones sin presión de selección ya se observa una

pérdida plasmídica (47%). Se puede considerar que pLS1 Δ A4-24 es ligeramente inestable ya que la tasa de pérdida, tras 100 generaciones fue de $L_{ex} = 0.0076$.

Podemos concluir que, *in vivo*, la región mínima que contiene un origen funcional necesario en *cis* para la replicación de pLS1 se encuentra en un fragmento de 247 pb, entre las coordenadas 402 y 648. Además, este origen puede ser dividido física y funcionalmente en dos regiones separadas: la región *nic*, donde la proteína produce el corte en el DNA y la región *bind*, que contiene las tres repeticiones directas a las cuales se une la proteína RepB (Fig. 13).

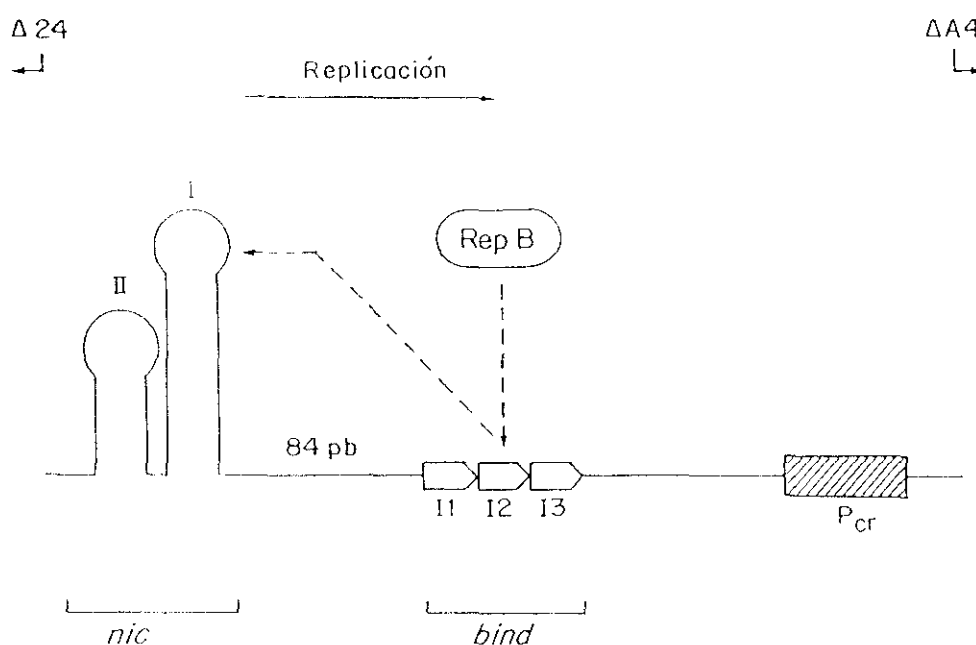


Figura 13. Representación esquemática de las características del origen de la cadena líder de pLS1. Se indican los extremos de las deleciones $\Delta 24$ y $\Delta A4$, que definen los bordes del origen, a la izquierda y derecha, respectivamente. Dentro de la región *nic* se encuentran las Horquillas I y II (aunque posiblemente no se forme por su alto contenido en A+T). Los iterones (11-13) constituyen la región *bind* y se indica su posición respecto a la región *nic* y al promotor P_{cr} (a partir del cual se cotranscriben los genes *copG* y *repB*). La línea discontinua muestra las posibles interacciones RepB-DNA. Asimismo se indica con una flecha, la dirección de la replicación desde el origen de la cadena líder de pLS1.

2. EL dso ES UN DETERMINANTE DE INCOMPATIBILIDAD

Una característica de los plásmidos es que si comparten regiones implicadas en su replicación y control son incapaces de coexistir en la misma célula en ausencia de presión selectiva, es decir, son incompatibles. Por lo tanto, era de esperar que el origen de replicación de la hebra líder fuese un determinante de incompatibilidad.

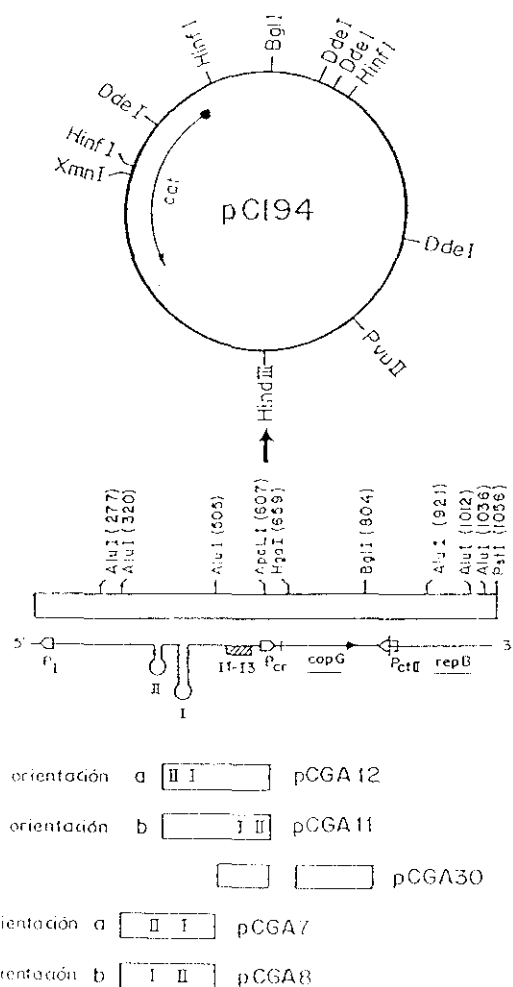


Figura 14. Construcciones utilizadas para analizar el *dso* como determinante de incompatibilidad. Se muestra un mapa circular de pC194*cop* con la dirección del gen *cat* y los sitios de restricción relevantes. Todos los clonajes se realizaron en el sitio *HindIII* único de pC194*cop*, que se ha señalado con una flecha. Debajo del mapa físico de la región pertinente de pLS1 se indica la posición relativa de las Horquillas I y II, de los tres íterones (II-13), de los promotores P_{cr} , P_{ctII} y P_I y de los genes *copG* y *repB*. Se muestran los nombres de las distintas construcciones, los fragmentos de pLS1 clonados en cada una de ellas y la orientación de los fragmentos clonados.

Para la realización del estudio sobre el *dso* de pLS1 como elemento de incompatibilidad, se utilizaron los plásmidos pCGA30, pCGA7, pCGA8, pCGA11 y pCGA12, que fueron construidos clonando la región *bind*, la región *nic*, o el *dso* entero, en el sitio único *Hind*III de pC194*cop* (replicón compatible con pLS1; Fig. 14). Los plásmidos pCGA7 y pCGA8 llevan el fragmento *Alu*I(320)-*Alu*I(505) de pLS1, que contiene la región *nic* del origen, en las dos orientaciones posibles. Estos plásmidos se emplearon como donadores en los ensayos de incompatibilidad. Para ello, cultivos competentes de *S.pneumoniae* que contenían pLS1 (plásmido residente) se transformaron con 1.4 μ g de DNA de los plásmidos pCGA7 y pCGA8, empleando pC194*cop* como control. En todos los casos se seleccionó para Cm, ya que los plásmidos donadores presentan resistencia a este antibiótico (gen *cat*). Las eficiencias de transformación fueron del orden de 2×10^4 transformantes/ml. Se eligieron varios clones, que se analizaron mediante preparaciones de DNA total y recuento en placa. Los análisis se realizaron en una situación inicial, que ha sido estimada en 37 generaciones (es decir, 25 generaciones necesarias para que una u.f.c. dé lugar a una colonia de tamaño medio y 12 generaciones más para que la porción de la colonia inoculada en medio líquido dé lugar a un cultivo crecido hasta una DO = 0.5; del Solar *et al*, 1989) y tras 60 generaciones más de crecimiento en presencia de Cm. En estas condiciones, se calcularon los porcentajes de células viables totales, los de células Cm^r (que contenían el plásmido donador) y los de células Tc^r (que mantenían el plásmido residente). Asimismo, se comprobó si existía algún cambio en el número de copias de pLS1. Los resultados obtenidos tras 97 generaciones de crecimiento con presión selectiva para el plásmido entrante, se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. La región *nic* por sí sola no ejerce incompatibilidad sobre pLS1.

	<u>Plásmido donador</u>		
	<u>pCGA7</u>	<u>pCGA8</u>	<u>pC194</u>
Células viables	1.8×10^8	1.6×10^8	1.8×10^8
% Cm ^r	97.8	100	100
% Tc ^r	94.5	100	100

Como se puede deducir, no se observó incompatibilidad apreciable mediada por la región *nic* del origen de replicación frente a pLS1 (Fig. 15A). Por otra parte, se observó una total compatibilidad entre pLS1 y pCGA30 (región *bind*).

Los ensayos de incompatibilidad realizados con pCGA11 y pCGA12, que llevan clonados el *dso* de pLS1 entero (región *bind* y *nic*) mostraron que en la situación inicial (37 generaciones), el número de copias de pLS1 se redujo notablemente (Fig. 15B). Tras 97 generaciones el porcentaje de células Tc^r (células que contenían pLS1)

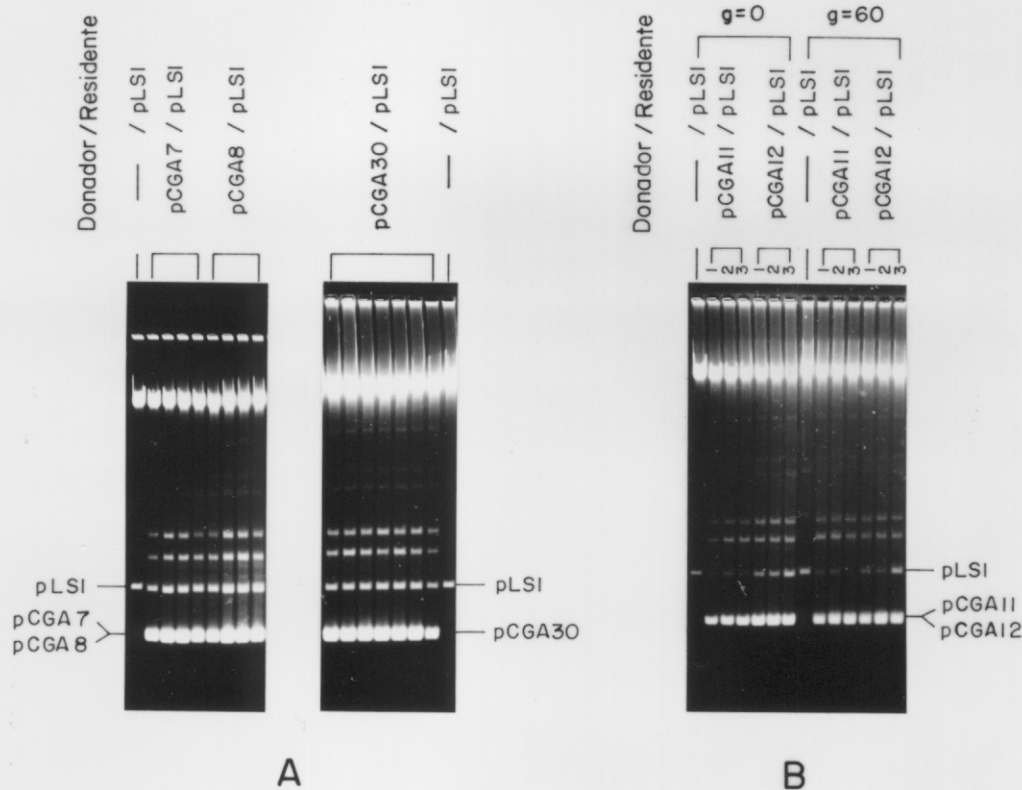


Figura 15 A, B. Efecto en *trans* de las regiones *nic*, *bind* y el *dso* intacto de pLS1 clonadas en pC194cop sobre el número de copias y estabilidad de pLS1. Cultivos de *S.pneumoniae* con el plásmido pLS1 como residente se transformaron con DNA del plásmido donador indicado. Los transformantes se seleccionaron en medio sólido con Cm (medio selectivo para el plásmido entrante). Se escogieron varios clones que fueron crecidos en medio líquido en presencia de Cm (g=0) hasta la mitad de la fase exponencial. Mediante diluciones apropiadas, estos cultivos se crecieron en el mismo medio durante 60 generaciones más (g=60). Se analizó el contenido de DNA total de la población heteroplasmídica a g=60. En el caso de los clones heteroplasmídicos que llevan pLS1 y pCGA11 o pCGA12 (que mostraron una ligera incompatibilidad) también se muestra el contenido de DNA total en la generación g=0.

fue del 60%, con una tasa de pérdida para pLS1 de $L_{ex} = 0.005$ (del Solar *et al*, 1993b). Como pCGA11/12 no llevan las secuencias que codifican para los determinantes de incompatibilidad de pLS1 (RNA II y CopG; del Solar y Espinosa, 1992), la incompatibilidad observada debe atribuirse a competición por la utilización de RepB. Estos experimentos indican que se necesita el *dso* entero (región *bind* y *nic*) para la funcionalidad *in vivo* de RepB y que cualquiera de las dos regiones del origen por separado no son suficientes para secuestrar RepB y reducir el número de copias de pLS1.

3. RepB ES CAPAZ DE ACTUAR EN TRANS

Para comprobar que la proteína RepB podría ser secuestrada por el *dso* entero clonado en un plásmido compatible y que, por tanto, es activa en *trans*, se utilizó el plásmido pLS1 Δ A15, derivado delecionado de pLS1 cuya deleción abarca las coordenadas 760-854 (Fig. 16). El plásmido pLS1 Δ A15 carece del RNA II, de parte del gen *copG* y del codón de iniciación del gen *repB*. Estudios preliminares de caracterización de pLS1 Δ A15 revelaron la presencia de un plásmido acompañante, que resultó ser pLS1. El análisis de la población heteroplasmídica inicial mostró que el número de copias plasmídico total fue de aproximadamente $N = 70$, y el número de copias de pLS1 se redujo a 15 (el valor N medio de pLS1 en *S.pneumoniae* es 22),

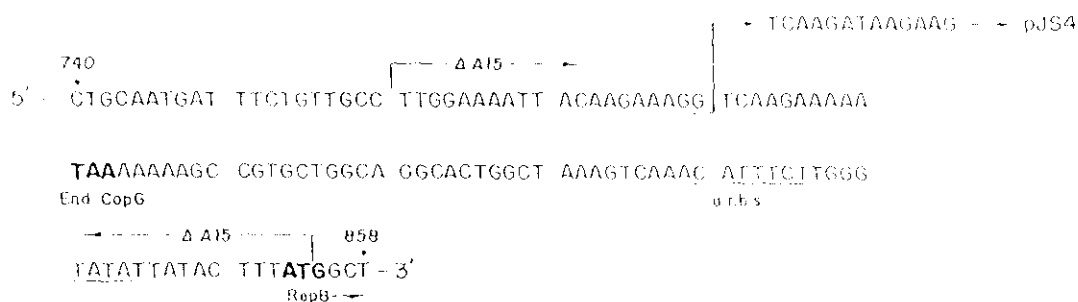


Figura 16. Secuencia de nucleótidos de pLS1 entre las coordenadas indicadas. Se indica la deleción $\Delta A15$ y el borde izquierdo de la deleción en pJS4. Se muestran en negrita el codón de terminación del gen *copG* y el codón de iniciación del gen *repB*, subrayado se encuentra el sitio atípico de unión a los ribosomas (a.r.b.s.) propuesto para el gen *repB* (Lacks *et al*, 1986).

ya que se observó que la proporción de pLS1 Δ A15 era de aproximadamente 3.7 veces más que el pLS1 acompañante. El plásmido pLS1 Δ A15 difiere de pLS1 en 95 pb. Esta diferencia se puede observar al digerir los DNAs de ambos plásmidos con *Apa*LI (coordinada 607 de pLS1) y *Bst*XI (coordinada 914 de pLS1), ya que pLS1 Δ A15 genera un fragmento de 212 pb y pLS1 uno de 307 pb. Estas digestiones se analizaron en un gel 5% PAA, y se realizaron densitometrías de varios negativos. Tras realizar las correcciones correspondientes al tamaño de las bandas, se obtuvo una relación de 3.7 veces más para la banda de 212 pb (pLS1 Δ A15) con respecto a la de 307 pb (pLS1). Cuando la población heteroplasmídica se creció en ausencia de presión selectiva se observó que, tras 60 generaciones, el porcentaje de células con plásmido (clones Tc^r) era del 3.4%, siendo la tasa de pérdida de $L_{ex} = 0.054$ (Fig 17). En este caso, la competición por la utilización de RepB entre plásmidos que comparten un *dso* entero podría ser un factor de incompatibilidad.

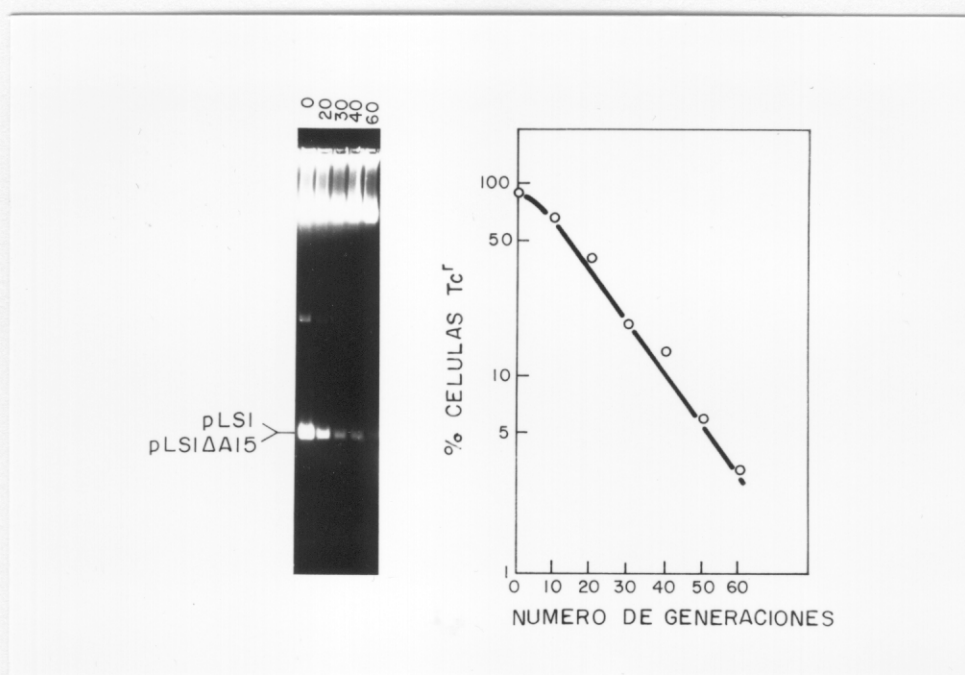


Figura 17. Actividad de RepB en *trans*. Se analizaron células de *S.pneumoniae* conteniendo pLS1 y pLS1 Δ A15, en condiciones de crecimiento sin presión selectiva durante las generaciones indicadas. Se obtuvieron preparaciones de DNA total a estas generaciones y se analizaron en geles de agarosa al 1.2%. Para los mismos cultivos se determinó, mediante siembra en placa, el porcentaje de células Tc^r. Los resultados se representaron en función del número de generaciones en ausencia de presión selectiva.

La estructura genética de pLS1ΔA15 sugiere que no es un plásmido auto-replicativo, aunque puede replicar cuando RepB se suplementa *en trans*. Para comprobar esta hipótesis, intentamos separar pLS1ΔA15 del pLS1 acompañante mediante una doble digestión *BanI-BstXI* que permite diferenciar los fragmentos pequeños de pLS1 (700 pb) y de pLS1ΔA15 (605 pb). Los fragmentos correspondientes a pLS1ΔA15 se purificaron, y el plásmido se reconstituyó mediante ligación. Se usó un cuarto de la ligación para transformar cultivos competentes de *S.pneumoniae* sin plásmido, obteniéndose tan sólo 730 transformantes/ml. El análisis del contenido de DNA plasmídico de varios clones reveló que la mayoría de ellos albergaban pLS1ΔA15 acompañado de pLS1. En otros casos apareció pLS1 sólo, quizás debido a contaminación de bandas durante la extracción. Otra parte de la ligación que reconstituye pLS1ΔA15 se utilizó para transformar células de *S.pneumoniae* con el plásmido pJS3*cop7* como residente (pJS3 está basado en el replicón pLS1 y lleva como marcador de selección el gen *cat* de pC194). Se escogieron dos clones que presentaban ambos plásmidos y se crecieron durante 60 generaciones más, seleccionando para el plásmido entrante (Tc') o para el plásmido residente (Cm') o bien en ausencia de presión de selección. Cuando se seleccionó para el plásmido entrante (pLS1ΔA15, Tc'), como sería lógico suponer, no se observó ninguna pérdida del plásmido residente (pJS3*cop7*, Cm') ya que este plásmido es el que proporciona RepB *en trans* a pLS1ΔA15. En los otros dos casos se observó una pérdida inicial de pLS1ΔA15 (sólo el 85% de las células fueron Tc'). Esta pérdida se incrementó tras sucesivas generaciones: el porcentaje de células Tc' fue del 34% cuando se seleccionó para el plásmido residente y sólo del 9% en ausencia de presión selectiva para ambos plásmidos (no mostrado). Quedaría por explicar por qué pLS1ΔA15 se mantiene en un alto número de copias (aproximadamente 55) al estar acompañado de pLS1 (que reduce su número de copias a 15) ya que el primero no parece utilizar mejor la proteína RepB que pLS1 en ensayos *in vitro* (ver más adelante). No obstante, los resultados demuestran que RepB es activa *en trans*.

El plásmido pFX2 de *L.lactis* (Xu *et al*, 1991), de la familia de pLS1, se pudo transferir a *S.pneumoniae* con eficiencia relativamente alta. Se determinó el número de copias de pFX2 en este huésped preparando extractos de DNA total de cultivos de *S.pneumoniae* que contenían los plásmidos pLS1, pLS1*cop7*, pLS1Δ24*cop7*, pLS5

y pFX2. Distintas cantidades de los extractos totales se analizaron en un gel de agarosa (1.2% en TAE). Se realizaron densitometrías de los negativos, calculándose el número de copias de pFX2 por comparación con los valores conocidos de pLS1 (22 copias) y pLS1*cop7* (120 copias). Se observó que pFX2 en *S.pneumoniae* presenta, aproximadamente, unas 11 copias por equivalente cromosómico (no mostrado). Asimismo, se determinó la estabilidad segregacional de pFX2. Para ello, se preparó un cultivo inicial, crecido hasta una $DO_{650} = 0.5$ en presencia de Cm (1.5 $\mu\text{g/ml}$), el cual se consideró como generación $g=0$. A partir de este cultivo, se realizaron diluciones sucesivas en medio sin presión selectiva durante una serie de generaciones, hasta $g=100$. Cada 10 generaciones se tomaron muestras del cultivo para analizar su contenido de DNA plasmídico y para las generaciones 0, 40, 60 y 100 se calculó el porcentaje de células con plásmido mediante recuento en placas con y sin presión selectiva. Se comprobó que, tras 100 generaciones en medio sin presión selectiva, pFX2 se mantiene estable (95% de Cm') en *S.pneumoniae* (resultados no mostrados).

Puesto que pLS1 y pFX2 presentan una alta homología en su región *nic* y en sus proteínas Rep, pero no en sus elementos de control (ctRNAs y proteínas Cop), resultaba interesante conocer su comportamiento cuando coexistiesen en el mismo huésped. Los estudios de incompatibilidad se realizaron en ambas direcciones, es decir, utilizando como plásmido entrante (donador) tanto pLS1 como pFX2, en estirpes de *S.pneumoniae* que ya contenían uno u otro de los plásmidos como residentes. Inicialmente la selección se realizó para el plásmido donador (Cm para pFX2 y Tc para pLS1) y se pudo comprobar que, en todos los casos, el número de transformantes fue mayor al utilizar pFX2 como plásmido donador. Tras realizar las correcciones oportunas por las diferencias en la competencia de ambos cultivos (transformaciones cromosómicas $T4/pLS1 = 6.1 \times 10^5 \text{ mal}'/\text{ml}$ y $T4/pFX2 = 3.5 \times 10^6 \text{ mal}'/\text{ml}$), se observó que la eficiencia de establecimiento de pFX2 fue unas 200 veces mayor que la de pLS1. Esta diferencia podría deberse, quizás, a que el gen *cat* (pFX2) se estuviese expresando mejor en *S.pneumoniae* que el gen *tet* (pLS1). No obstante, esta hipótesis se descartó comprobando que pC194*cop* (con el mismo gen *cat* que pFX2) se estableció con la misma o menor eficiencia que pLS1 en pneumococos (resultados no mostrados). La incompatibilidad ejercida por pFX2 sobre pLS1 se analizó por transformación de un cultivo competente de *S.pneumoniae* conteniendo

pLS1 (plásmido residente) con DNA de pFX2. Los transformantes se seleccionaron para el plásmido entrante, analizándose el contenido de DNA total de varios clones. Encontramos tres situaciones iniciales: i) disminución del número de copias de pLS1 (clon 5), ii) pérdida acusada de pLS1 (clones 1 y 2), iii) ausencia de pLS1 (clones 3, 4 y 6). Se escogió un clon representativo de cada una de las situaciones iniciales ($g=0$) y mediante diluciones sucesivas, se crecieron durante 60 generaciones en medio con presión selectiva para el plásmido entrante (pFX2). Como control se creció un cultivo de *S.pneumoniae* con pLS1 en medio sin presión selectiva. Se analizó el contenido de DNA total de los tres clones elegidos (clones 1, 3 y 5) en la generación inicial ($g=0$) y tras 60 generaciones más en medio con Cm ($g=60$), y cada 10 generaciones se calculó el porcentaje de células que contenían pLS1. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18A y los valores determinados para la presencia de pLS1 (residente) en cada caso y generación, se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Incompatibilidad ejercida por pFX2 hacia pLS1.

Nº Clon	% Células Tc ^r en la generación		L _{ex}
	g= 0	g= 60	
5	44	32	0.005
1	25	9.6	0.016
3	0.02	0.00025	>0.076

Estos resultados sugieren que durante el establecimiento de pFX2 se produce incompatibilidad hacia el plásmido pLS1 residente. Una vez establecidos ambos plásmidos, los clones que contenían pLS1 en cantidades detectables (clones 1 y 5) se crecieron en medio sin presión selectiva o seleccionando para el plásmido residente (Tc) durante 60 generaciones más. En el primer caso, no se observó pérdida apreciable de ninguno de los plásmidos, mientras que cuando la selección se realizó para pLS1 se observó que el número de copias de éste fue aumentando hasta más del doble del valor original (resultados no mostrados). Para estudiar la situación inversa, se transformó un cultivo competente de *S.pneumoniae*/pFX2 con DNA de pLS1 y se

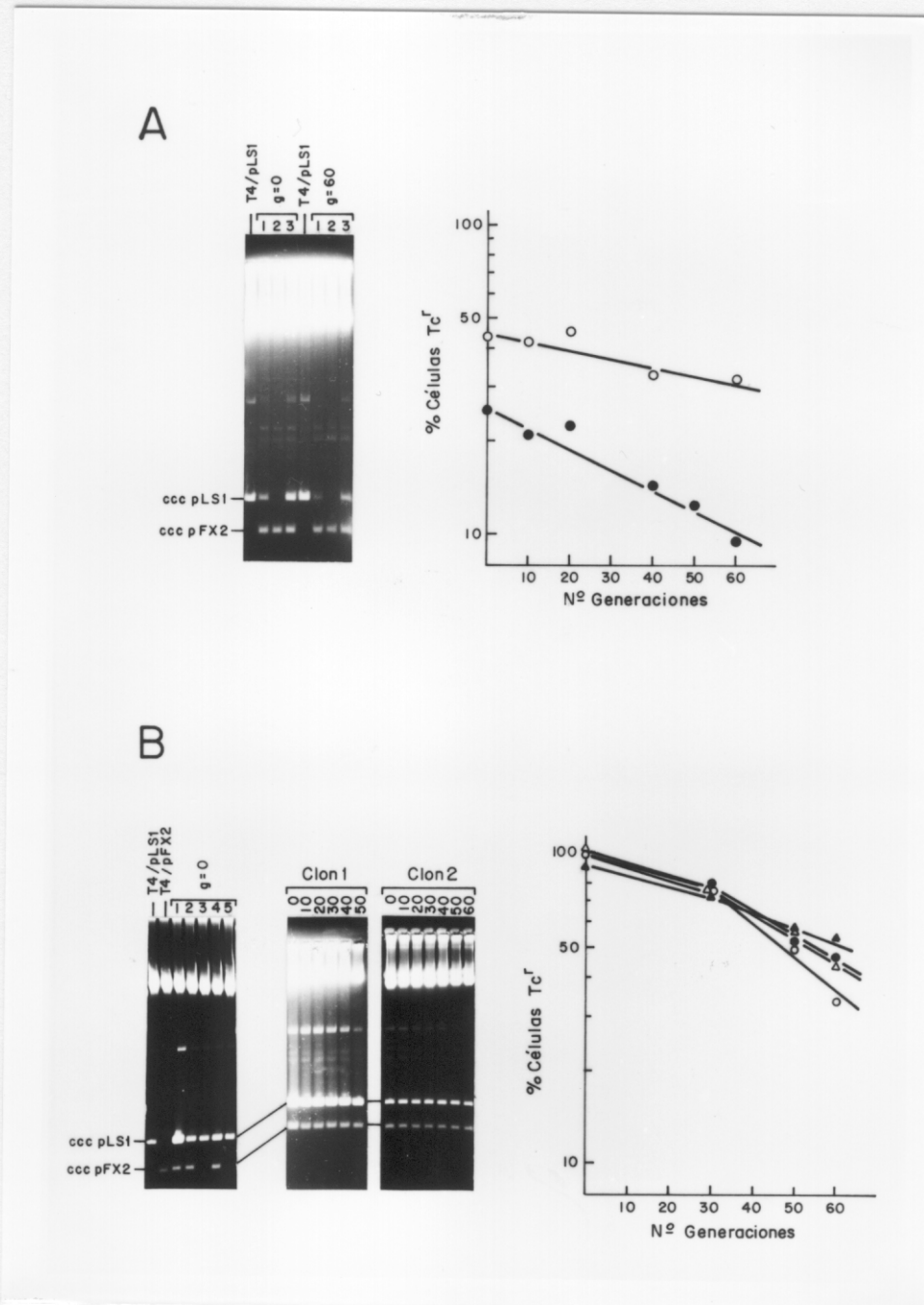


Figura 18. Incompatibilidad entre pLS1 y pFX2 en *S.pneumoniae*. **A.** Células de *S.pneumoniae* con pLS1 se transformaron con pFX2 y los transformantes se seleccionaron para el plásmido entrante. Se escogieron tres clones (1, 3 y 5) que fueron crecidos en medio con Cm ($g=0$) y por diluciones sucesivas en este medio se crecieron durante 60 generaciones más ($g=60$). Como control se incluyó un cultivo de *S.pneumoniae* con pLS1. Se analizó el contenido de DNA total a la $g=0$ y $g=60$ de cada clon en geles de agarosa al 1.2% y se representó gráficamente el porcentaje de células Tc^r para cada 10 generaciones del cultivo seleccionando para Cm. **B.** Cultivo de *S.pneumoniae* conteniendo pFX2 como plásmido residente se transformó con DNA de pLS1. Los transformantes se seleccionaron para el plásmido entrante y fueron crecidos durante 60 generaciones en medio con Cm (selección para el plásmido residente). Se analizó el contenido de DNA total de varios clones a la $g=0$ y $g=60$ en geles 1.2% agarosa. Representación gráfica del porcentaje de células Tc^r (que contienen el plásmido entrante) en varios clones seleccionados, a las generaciones indicadas de crecimiento en medio selectivo con Cm.

seleccionó para el marcador del plásmido entrante (Tc). El análisis de los transformantes nos mostró cuatro situaciones iniciales: i) presencia de los dos plásmidos en su número de copias normal (clones 2' y 4'); ii) aumento acusado del número de copias de pLS1 y valor normal para pFX2 (clones 1, 2, 3, 6, 8, 1', 7' y 10'); iii) disminución del valor de N de pFX2 y valor normal para pLS1 (clon 12'); y iv) ausencia de pFX2 (clones 4, 5, 7, 3', 5', 6', 8', 9' y 11'). Se analizaron las situaciones que presentaban ambos plásmidos y un valor de N normal para el pFX2. Cuando se seleccionó para el plásmido entrante (pLS1) en aquellos clones que presentaban un alto número de copias de pLS1, no se observó pérdida del plásmido residente (pFX2) y se mantuvo el valor de N para pLS1, durante las primeras 30 generaciones. De igual forma, en los clones con un valor normal de N para ambos plásmidos, la situación se mantuvo estable al seleccionar para el plásmido entrante (no mostrado). Si la selección se invierte (seleccionando ahora para el plásmido residente, pFX2), el número de copias del pLS1 se mantuvo prácticamente igual en los clones que presentaban ambos plásmidos con un valor de N normal, pero disminuyó claramente en aquellos clones que presentaban inicialmente un valor N alto para pLS1; el valor medio para la tasa de pérdida en estos clones fue de $L_{ex} = 0.015$ (Fig 18B).

Los resultados sugieren que existe una débil incompatibilidad entre plásmidos que comparten homologías en el *dso* y que esta incompatibilidad parece ejercerse más fuertemente durante el establecimiento plasmídico que una vez establecida la situación heteroplasmídica.

Replicación conducida por la proteína RepB

A continuación, se realizaron intentos para conseguir la replicación conducida de plásmidos recombinantes que llevan el *dso* entero de pLS1 (pCGA11 y pCGA12) suministrando RepB en *trans*. Para ello, se realizaron dos ensayos: i) delección de parte del gen *rep* de pC194*cop*, y ii) delección de la horquilla del *dso* de pC194*cop*. En primer lugar, se transformó un cultivo competente de *S.pneumoniae* con DNA de pLS1*cop*7 (110 copias) como plásmido donador de RepB en *trans*, y estos cultivos se pusieron, a su vez, competentes. La delección del gen *rep* de pC194*cop* se realizó por digestión de DNA de pCGA11 (5 μ g) con *Nsi*I, ya que dentro del gen *rep* se encuentran dos sitios *Nsi*I separados aproximadamente 460 pb (Fig. 19). El fragmento

grande de pCGA11/*Nsi*I fue extraído de un gel de agarosa y recircularizado. Se usó la mitad de la ligación para transformar *S.pneumoniae* con pLS1*cop*7 y se seleccionó en medio sólido suplementado con Tc y Cm. No se obtuvo ningún transformante. Se realizó una nueva transformación con el resto de la ligación con el mismo resultado negativo.

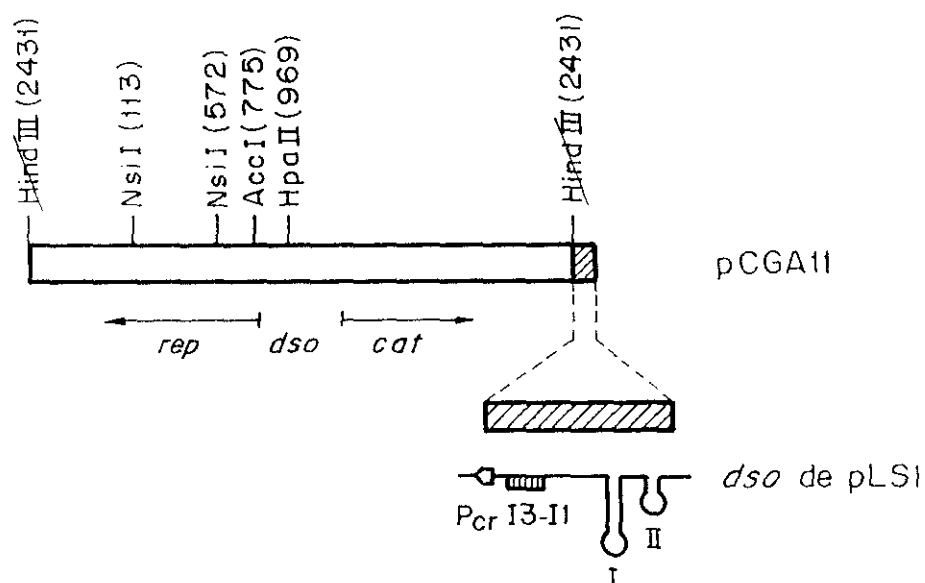


Figura 19. Mapa físico y funcional del plásmido recombinante pCGA11, en el que se muestra el fragmento de pLS1 clonado en el sitio *Hind*III único de pC194*cop*. Se indican los sitios de restricción más relevantes y las coordenadas de corte en pC194*cop*. Se indica asimismo, la localización de los genes *rep* y *cat* y del origen de replicación (*dso*) de pC194*cop*. Debajo del fragmento de pLS1 se muestra la posición de las Horquillas I y II, los tres iterones (I1-I3) y el promotor P_{cr}.

El segundo intento para conducir replicación se hizo mediante delección del *dso* de pC194*cop*, la cual se llevó a cabo por doble digestión *Acc*I-*Hpa*II de pCGA11 (Fig. 19). De esta manera, se elimina un fragmento de 194 pb que contiene el origen de replicación de pC194*cop*. El fragmento grande de pCGA11/*Acc*I-*Hpa*II se purificó, se rellenaron los extremos 5'-protuberantes y se recircularizó el plásmido. Tampoco este experimento tuvo éxito, ya que no se obtuvieron transformantes. Por tanto, y con las salvedades de los resultados negativos, concluimos que no se puede construir un plásmido basado en el replicón de pC194 que lleve solamente el *dso* de pLS1 y cuya replicación sea conducida por RepB suministrada en *trans*.

Utilizando el plásmido pFX2, se realizaron dos nuevos ensayos con la intención de conducir la replicación de este plásmido, suministrando en *trans* la proteína RepB de pLS1. El primer intento consistió en eliminar 109 aa (47%) de la región N-terminal de la proteína RepX de pFX2. Para ello, se eliminó el fragmento pequeño *Bst*UI-*Nde*I de 385 pb (328 de los cuales pertenecían al gen *repX*). Tras purificar el fragmento mayor, rellenar los extremos 5'-protuberantes con Pol IK y ligar, se transformó un cultivo competente de *S.pneumoniae*/pLS1. Todos los clones analizados (22 clones) contenían un pFX2 intacto. En el segundo ensayo se digirió DNA de pFX2 con *Nde*I, sitio único situado hacia la mitad del gen *repX*. El relleno de los extremos introduce 2 pb, cambiándose el marco de lectura de *repX* e introduciéndose un codón de terminación. Después de transformar un cultivo competente de *S.pneumoniae*/pLS1, se analizaron 20 clones. Sólo tres de ellos contenían pFX2 y los tres poseían un sitio *Nde*I intacto, mientras que el resto de los clones *Cm*^r no mostraron plásmido. También se realizó un intento para conducir la replicación de pLS1 suministrando en *trans* la proteína RepX de pFX2. En este caso, se intentó introducir un codón de terminación en la región N-terminal de RepB, digiriendo con *Bst*XI (sitio único en la coordenada 914 de pLS1) y rellenando los extremos (con lo cual se introducirían 4 pb nuevas). La ligación se volvió a digerir con *Bst*XI, obteniéndose el mismo resultado negativo que en el caso anterior, ya que no se consiguió ningún transformante de *S.pneumoniae*/pFX2 que tuviese los mutantes deseados de pLS1.

Concluimos, por tanto, que a pesar de los repetidos intentos empleando diversas estrategias, no se ha podido, hasta el momento, conducir replicación de pLS1 suministrando RepX de pFX2 en *trans* o viceversa, ni conducir replicación del *dso* de pLS1.

4. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RepB

Para purificar la proteína RepB se empleó el sistema de clonaje vector pET5/huésped *E.coli* BL21(DE3), descrito por Studier y Moffatt (1986), buscando con ello una hiperexpresión específica del gen *repB*. La estirpe BL21(DE3) contiene un profago defectivo de λ , que lleva el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el promotor inducible *lacUV5*. A su vez, el vector pET5 contiene el promotor $\phi 10$, que es reconocido específicamente por la RNA polimerasa de T7 y bajo el cual se clona el gen que se quiere expresar. Empleamos la estirpe BL21(DE3) que contiene el plásmido pLS19 (Fig. 20; del Solar *et al.*, 1989). Este plásmido es un derivado de pLS21 (híbrido formado por pLS5 y pET5, unidos en sus sitios *EcoRI* únicos; del Solar *et al.*, 1989) al que se le delecionaron los dos fragmentos *BclI* menores situados en el interior del gen *tet* de pLS5. En trabajos anteriores (de la Campa *et al.*, 1990; del Solar, 1991) se ensayaron diferentes condiciones de inducción con IPTG y de tratamiento con Rif, así como distintas construcciones de plásmidos con el fin de obtener el mejor rendimiento de RepB. Esto se consiguió usando la estirpe BL21(DE3) que contiene el plásmido pLS19 y realizando una inducción de 30 min a 37°C con 1 mM IPTG seguida por un tratamiento con 200 μ g/ml de Rif durante 90 min a 37°C. Para la purificación de RepB se siguió el método descrito por de la Campa *et al.* (1990) con las modificaciones indicadas en Materiales y Métodos.

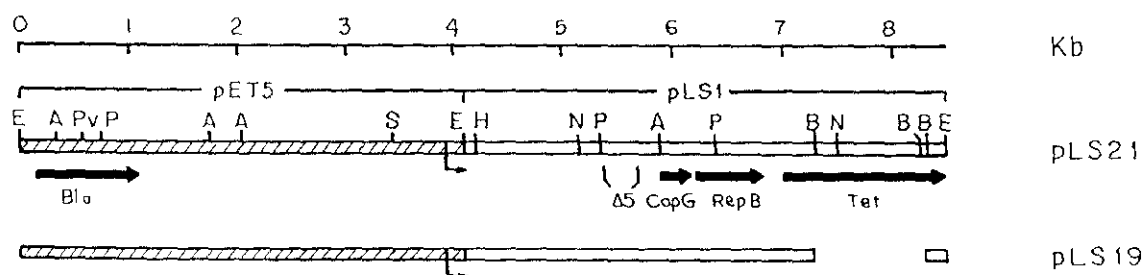


Figura 20. Mapa físico y funcional del plásmido recombinante pLS19, utilizado para la hiperexpresión de *repB*. El plásmido pLS21 es un híbrido entre pET5 y pLS5. En el mapa se indica la posición y dirección de transcripción (\rightarrow) del promotor $\phi 10$, la región de pLS1 delecionada en pLS5 ($\Delta 5$), los productos génicos Bla, CopG, RepB y Tet (\rightarrow) y algunos sitios de restricción (E: *EcoRI*, A: *ApaI*, Pv: *PvuI*, P: *PstI*, S: *SalI*, H: *HindIII*, N: *NcoI*, B: *BclI*). La región delecionada en el plásmido pLS19 se muestra como una zona hueca.

Se partió de 2 l de cultivo, crecido a una $DO_{600} = 0.45$. En este momento se indujo con IPTG y se incubó a 37°C durante 30 min, seguido de adición de Rif e incubación durante 90 min. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en tampón H (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 5 mM DTT y 5% EG) suplementado con 150 mM KCl. Se lisaron las células, y los ácidos nucleicos y proteínas asociadas a ellos se eliminaron por precipitación con 6% de sulfato de estreptomicina (Sm). La fracción proteica se recogió por centrifugación, tras una precipitación con sulfato amónico al 70% de saturación. El sedimento se disolvió en tampón H suplementado con 300 mM KCl y se dializó frente a 1 l del mismo tampón. El contenido de la bolsa de diálisis presentaba un aspecto ligeramente turbio. Por ello, las proteínas precipitadas se separaron de las solubles por centrifugación y se analizaron mediante SDS-PAGE. La proteína RepB se detectó mayoritariamente en el sobrenadante. A continuación, se dializó este sobrenadante frente a 1 l de tampón H sin KCl. El contenido de la bolsa de diálisis presentaba un aspecto turbio, por lo

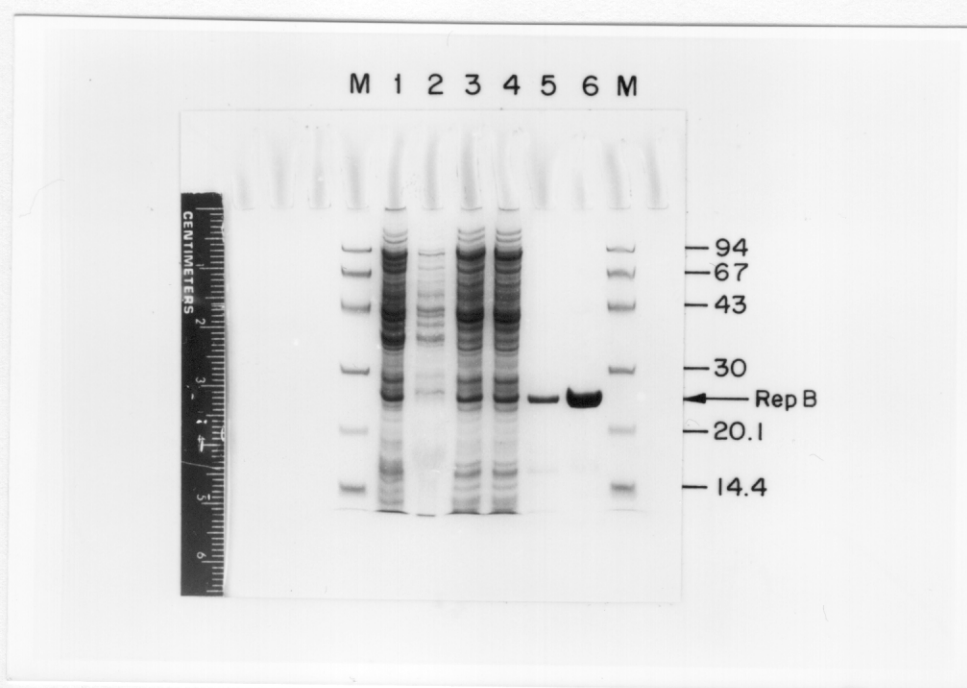


Figura 21. Etapas de la purificación de la proteína RepB analizadas mediante SDS-PAGE (12% PAA). En el gel se cargaron muestras (3 μ l) correspondientes a: (1) extracto crudo, (2) sobrenadante de la etapa de precipitación con sulfato de Sm, (3) fracción precipitada con sulfato amónico y (4) fracción dializada frente a 0.3 M de KCl. Asimismo, se cargaron: (5) 1.5 μ l de una muestra de 100 μ l precipitada con TCA obtenida de la primera columna de heparina-agarosa y (6) 3 μ l de una muestra de 50 μ l, conteniendo RepB pura, obtenida de la segunda columna de heparina-agarosa. Como control de tamaño se utilizó un patrón de proteínas estándar (M).

Tabla 6. Resumen de las etapas de purificación de RepB. La determinación de las concentraciones proteicas de cada una de las distintas etapas de purificación se realizó utilizando el sistema BCA (Pierce).

Etapa de purificación	Muestra		Valores totales	
	A ₁ -A ₀	[μg/ml]	Volumen(ml)	Proteína(mg)
Extracto crudo	0.473	400	20	240.0
Sulfato de Estreptomicina	0.651	560	26	218.0
Sulfato amónico	0.314	270	22	178.0
1ª Diálisis	0.273	230	15	103.5
1ª Heparina-agarosa	0.044	110	20	3.0
2ª Heparina-agarosa	-	-	6	0.3

cual, se separaron por centrifugación las proteínas solubles de las insolubles (o con muy baja solubilidad) en estas condiciones. Nuevamente, se analizó el precipitado y el sobrenadante mediante SDS-PAGE y se observó un gran enriquecimiento de RepB en el precipitado. A continuación, se disolvió el precipitado en 20 ml de tampón H suplementado con 300 mM KCl y se cargó en una columna de heparina-agarosa equilibrada con el mismo tampón. Las proteínas adsorbidas a la matriz se eluyeron con un gradiente lineal de tampón H con KCl (300 a 600 mM), recogiendo fracciones de 2 ml. De las fracciones 68 a 88 (que incluían un pico proteico) se tomaron muestras de 100 μl, se precipitaron con acetona o con TCA, y las proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE. El rendimiento obtenido en la precipitación fue mucho mayor con TCA. Se eligieron las fracciones 80 a 89 y se cargaron en una segunda columna de heparina-agarosa. La elución se realizó con un gradiente lineal de KCl (0.3 a 1 M), recogiendo fracciones de 2 ml. Se analizaron 50 μl de las fracciones 63 a 69 correspondientes al pico proteico, precipitándolas con TCA y se eligieron las fracciones 64, 65 y 66 por su mayor concentración de RepB y gran pureza (>95%). Para su conservación, la proteína RepB pura se repartió en alícuotas de 50 μl que se congelaron inmediatamente a -70°C (Fig 21; Tabla 6). La proteína mantuvo su actividad por lo menos un año en estas condiciones.

5. COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR Y COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS DE RepB

La concentración de la proteína RepB purificada se calculó a partir del análisis de su composición de aa realizado por el Servicio de Química de Proteínas del CIB (Tabla 7). Aunque hubo problemas en la determinación de Trp y Arg, los valores obtenidos experimentalmente se ajustaron fielmente a los valores esperados. La concentración calculada para RepB fue de 45 ng/ μ l. En una segunda purificación de RepB, se obtuvo una preparación de 55.8 ng/ μ l, cuya concentración se calculó por densitometría de geles SDS-PAA teñidos con CBB. Se calculó el coeficiente de extinción molar teórico de RepB a partir del valor del número de residuos por el coeficiente de extinción a $\lambda=280$ para los aa Trp, Tyr y Phe respecto a la masa molecular de RepB (ver Materiales y Métodos). El valor obtenido fue de 1.0235 ml $\text{mg}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Se realizó una medida de la absorbancia de RepB a 280 nm frente a tampón H suplementado con 425 mM de KCl; el valor obtenido fue de 0.179.

Tabla 7. Análisis de la composición de aminoácidos de RepB. El valor de la masa molecular de RepB determinado a partir de su secuencia es igual a 24252.2 Da. El volumen inyectado en el analizador fue de 50 μ l frente a un volumen total de muestra de 200 μ l. La cantidad de μ g hidrolizados fue de 42.91 μ g.

aa	nmol	ng	nº residuos	%	aa esperados	nmol/residuos
Asx	10.67	1228.47	24.13	11.04	25	0.43
Thr	5.24	530.16	11.86	5.42	11	0.48
Ser	4.70	409.11	10.62	4.86	10	0.47
Glx	9.66	1246.48	21.83	9.99	19	0.51
Pro	2.50	242.75	5.65	2.59	5	0.50
Trp	0.00	0.00	0.00	0.00	1	0.00
Gly	8.63	492.63	19.50	8.92	9	0.96
Ala	7.00	497.70	15.83	7.24	13	0.54
Val	5.85	579.77	13.23	6.05	16	0.36
Met	1.73	226.62	3.90	1.79	5	0.34
Ile	5.94	672.13	13.42	6.14	14	0.42
Leu	10.63	1203.65	24.04	11.00	24	0.44
Tyr	5.61	915.14	12.68	5.80	13	0.43
Phe	4.46	657.14	10.09	4.62	8	0.56
Lys	11.63	1491.56	26.30	12.03	25	0.46
His	2.44	334.21	5.51	2.52	5	0.49
Arg	0.00	0.00	0.00	0.00	7	0.00
Total	96.69	10727.50	218.58	100.01	210	Valor medio 0.459

6. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE RepB MEDIANTE EQUILIBRIO DE SEDIMENTACIÓN

Para conocer la configuración nativa de la proteína RepB se llevaron a cabo experimentos de equilibrio de sedimentación, realizados a dos concentraciones distintas de proteína (0.02 y 0.04 $\mu\text{g/ml}$) y a 10°C (ver Materiales y Métodos). El cálculo de la masa molecular aparente de las distintas muestras fue corregido para el valor del volumen específico parcial (v) de la proteína (0.749 ml/g; calculado a partir de la composición de aa) y para el valor de la masa molecular del monómero de RepB (24252 Da, calculado a partir de los datos de secuencia). El resultado correspondiente a la masa molecular de RepB, determinada por equilibrio de sedimentación fue de 136000 ± 3500 Da (Fig 22), que se corresponde, aproximadamente, a la de un hexámero (valor igual a 6.056) de RepB (24252 Da de secuencia). El hecho de que al diluir a la mitad la concentración de proteína (0.02 $\mu\text{g/ml}$), la masa molecular disminuya (114000 ± 2700 Da) es indicativo de que RepB no es una especie única, probablemente debido a un equilibrio de homo-asociación (McRorie y Voelker, 1993). Experimentos adicionales realizados a temperaturas superiores (25 y 37°C) nos mostraron una pérdida acusada en la señal de absorbancia. Se comprobó que esto era debido a la adherencia de la proteína RepB a las paredes de las células utilizadas para los experimentos a esas temperaturas.

7. ACTIVIDAD TIPO TOPOISOMERASA I DE RepB: CONDICIONES ÓPTIMAS PARA SU ACTIVIDAD

Para comprobar la actividad de RepB sobre DNA superenrollado, se realizó un primer ensayo con el plásmido pLS1 Δ 24cop7, utilizando distintas concentraciones de DNA y proteína. Se realizó una mezcla inicial que contenía tampón B (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1 M KCl, 5 mM DTT), DNA de pLS1 Δ 24cop7 (concentración final de 28 ng/ μl) y 20 mM MnCl₂, manteniéndose durante 10 min a t.a. Distintas cantidades de esta mezcla inicial (entre 25 y 29.7 μl ; de 700 a 840 ng de DNA) recibieron distintas cantidades de RepB (11.2 a 135 ng) llevándolas a un volumen final de reacción de 30 μl . Se incluyeron cuatro muestras (entre 2.2 y 22.5

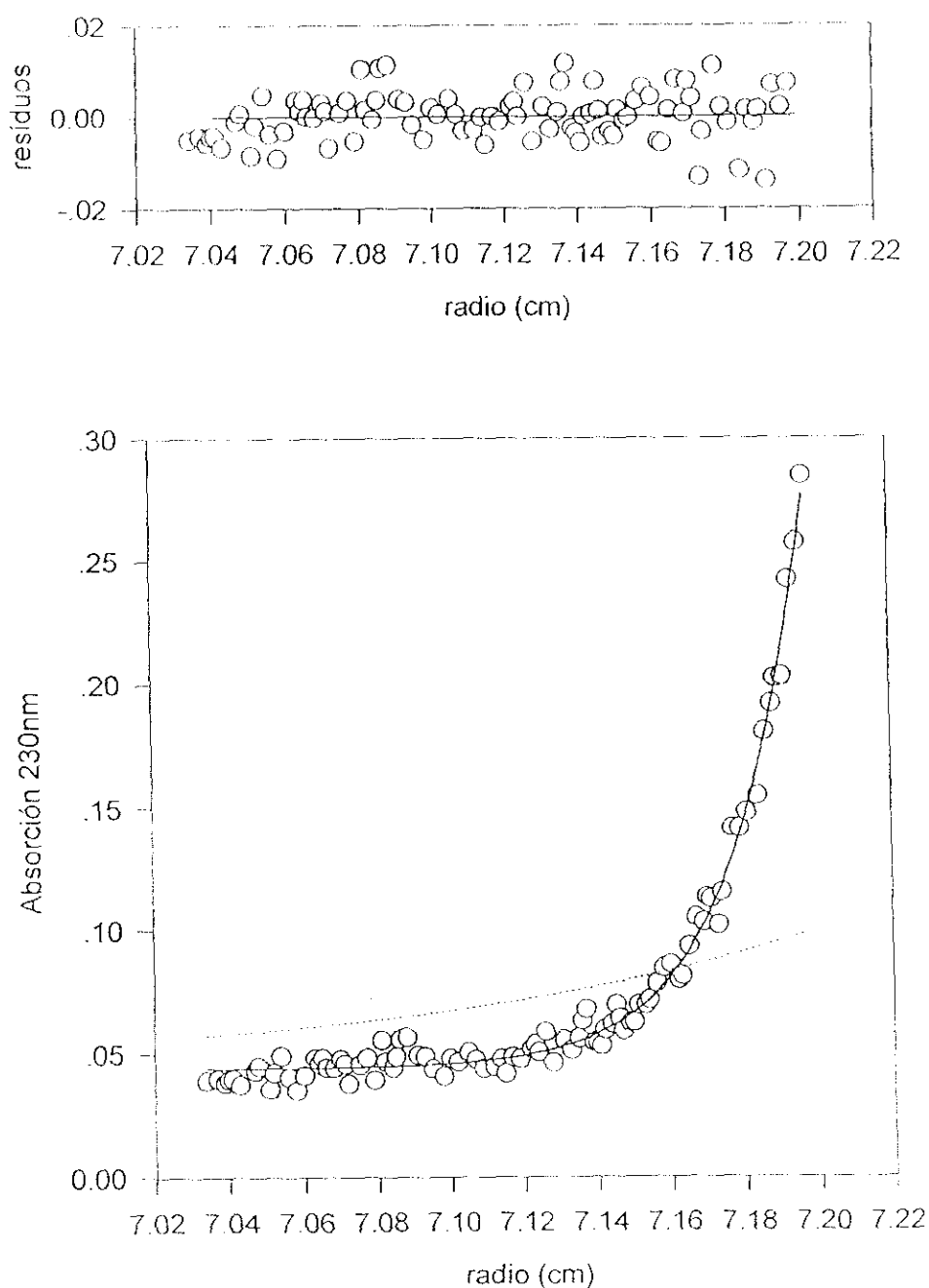


Figura 22. Panel inferior. Perfil de equilibrio de sedimentación de RepB ($0.04 \mu\text{g/ml}$). Distribución radial de absorbancias (230 nm) a 25000 rpm y 10°C . Los símbolos representan los puntos experimentales y la línea continua representa la distribución radial del mejor ajuste experimental a un modelo simple de equilibrio de sedimentación (136000 Da, ver Materiales y Métodos). A modo ilustrativo se indica con trazo discontinuo el perfil de equilibrio de sedimentación del monómero de RepB (24000 Da). Panel superior. Distribución de residuos en el ajuste estadístico.

ng de RepB) de la proteína diluida 10 veces en tampón D (tampón B suplementado con $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA). Todas las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C , y la reacciones se pararon con $125 \mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinasa K, incubando durante 10 min a 20°C . Tras añadir el tampón de carga BXGE, las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1% en tampón TBE con $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ de EtBr), a un voltaje constante de 45 V durante 20 h. El gel fue fotografiado bajo luz UV y se realizó una densitometría del negativo con el fin de calcular el porcentaje de actividad de RepB. Puesto que RepB posee una actividad de corte/cierre tipo topoisomerasa I-5', su acción sobre DNA superenrollado circular covalentemente cerrado (formas CCC o FI) dará dos productos: formas circulares abiertas (OC o FII) como productos de la actividad de corte, y formas circulares relajadas (RC o FI') como productos de corte/cierre. Estas tres formas de DNA plasmídico poseen intensidades de fluorescencia diferentes, debido a que el EtBr se intercala de distinta manera entre ellas. Por ello, el rendimiento de los productos de corte/cierre de RepB se calculó por disminución de la señal de fluorescencia de la forma FI del DNA no tratado con RepB. También se observó que el KCl presente en el tampón de incubación, puede generar inespecíficamente una pequeña proporción de formas FII. Por ello, se calculó este porcentaje en la muestra no tratada y se restó en los cálculos realizados para las muestras incubadas con RepB.

Los resultados obtenidos en este primer ensayo se muestran en la Figura 23. En ningún caso se consiguió una actividad total de RepB, ya que en todas las muestras se pudo observar una determinada cantidad de DNA superenrollado (formas FI). Hay que señalar que en las muestras tratadas con la proteína RepB diluida 10 veces no se observó actividad alguna, lo que indicaría que la dilución de la proteína en el tampón usado, conduce a su inactivación.

Para determinar diversos parámetros de la actividad de RepB, se estudiaron las condiciones óptimas de análisis de los productos de reacción. Asimismo, se hicieron otra serie de ensayos en los que se variaron las concentraciones de los distintos componentes de la reacción, los tiempos y las temperaturas de incubación. Se ensayó, además, la actividad de RepB en presencia o no de otras proteínas, de un inhibidor de la topoisomerasa I, y en presencia de algunos detergentes.

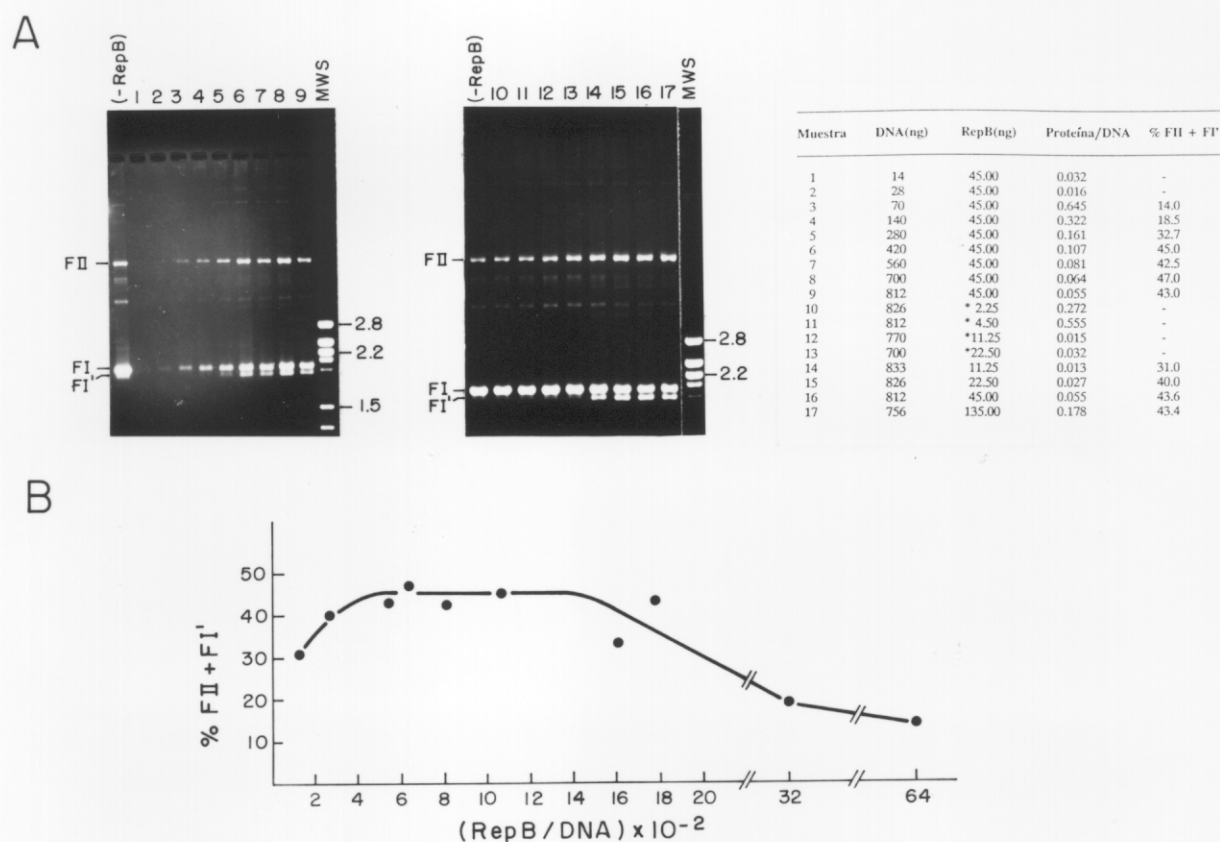


Figura 23. A. Actividad de la proteína RepB sobre DNA de pLS1 Δ 24*cop7* a concentraciones variables de DNA y proteína. En las muestras señaladas con un (*) se utilizó la proteína RepB diluida 10 veces en tampón D (ver texto). El símbolo (-) indica producto no detectable. Los ensayos se realizaron durante 30 min a 37°C. Los productos de reacción se analizaron en geles de agarosa al 1% en tampón TBE con 1 μ g/ml de EtBr. FI: forma superenrollada; FII: forma circular abierta; FI': forma circular cerrada y relajada; MWS: marcadores de peso molecular. **B.** Representación gráfica de los productos generados por RepB (% FII + FI') frente a la relación proteína/DNA utilizada en la reacción.

7.1. Condiciones de análisis de productos de reacción. Para optimizar los resultados se probaron distintas condiciones en el análisis de los productos de reacción: porcentaje de agarosa, concentración de EtBr y presencia o no de éste durante la electroforesis, tampón de electroforesis y duración de ésta, etc. Se realizó un ensayo de actividad de RepB (45 ng) sobre el plásmido pLS1 Δ 24*cop7* (810 ng) en presencia de tampón B con 20 mM MnCl₂ en un volumen final de 30 μ l. La mezcla se incubó 30 min a 37°C y se paró la reacción por adición de 125 μ g/ml de proteinasa K. Los

productos de reacción se analizaron en geles con distintos porcentajes de agarosa (0.7, 1, 1.5 y 2%). Asimismo, se ensayaron dos concentraciones distintas de EtBr (0.5 y 1 $\mu\text{g/ml}$), incluyéndolo en la preparación del gel y en el tampón de electroforesis (no mostrado). Los mejores resultados en cuanto a resolución y nitidez de bandas, se obtuvieron con el gel de agarosa al 1% que contenía 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de EtBr. A porcentajes mayores de agarosa, se obtuvo una mejor separación para las formas FI y FI', pero se observaba una difusión de las bandas a lo largo del gel, que dificultaría la cuantificación de los productos de reacción. En cuanto a la elección del tampón de electroforesis y duración de la misma, se optó por el tampón TBE, por su mayor estabilidad en electroforesis de larga duración, realizadas a voltajes bajos. Se observó una mayor resolución y separación de las bandas FI y FI' en las electroforesis que realizamos entre 2.5 y 3 V/cm (no mostrado); por ello, se optó por utilizar cubetas horizontales largas, voltajes bajos (30-40 V) y tiempos largos de electroforesis (16-20 h). De la misma forma, se realizaron geles en ausencia de EtBr en el tampón de electroforesis, que fueron teñidos posteriormente con 0.5 $\mu\text{g/ml}$ EtBr. En estos casos, se observaron distintas bandas correspondientes a las formas FI', que migran en distintas posiciones entre la banda de formas FII y la banda de FI, y manifiestan su distinto grado de superenrollamiento, provocado por la presencia de EtBr. Los geles sin EtBr no se utilizaron cuando era necesario una cuantificación de los productos de reacción.

7.2. Concentración de sustrato. A partir de una mezcla inicial compuesta por DNA de pLS1 Δ 24*cop7* (a una concentración final de 28 ng/ μl), tampón B y 20 mM MnCl_2 , se prepararon distintas muestras con cantidades variables de DNA (valores comprendidos entre 14 y 812 ng) y una concentración constante de proteína RepB (45 ng). Las reacciones se llevaron a un volumen final de 30 μl y se incubaron a 37°C durante 30 min, al cabo de los cuales se les añadió proteinasa K. Las muestras se analizaron por electroforesis y se calculó el porcentaje de moléculas (FII + FI'), productos de la actividad de RepB (no mostrado). El mayor porcentaje de actividad con 45 ng de RepB se consiguió con 700 ng de DNA, siendo el cociente DNA/proteína igual a 15.5.

7.3. Concentración de proteína. Para analizar el efecto de la concentración de RepB sobre su actividad, se prepararon varias muestras con una cantidad constante de DNA de pMV158 (700 ng), a las cuales se les añadió una cantidad variable de proteína (entre 11.2 y 112.5 ng; Fig. 24B). Las reacciones se llevaron a cabo de la misma forma que la vez anterior. Con el fin de obtener un mayor porcentaje de formas (FII + FI') frente a las moléculas FI (sobre las que RepB no ha actuado), se realizó un segundo experimento disminuyendo la cantidad de DNA sustrato (232 ng) y utilizando cantidades de proteína comprendidas entre los 45 y 112.5 ng (Fig. 24A). En ninguno de los casos, el porcentaje de actividad superó el 30% de formas (FII + FI').

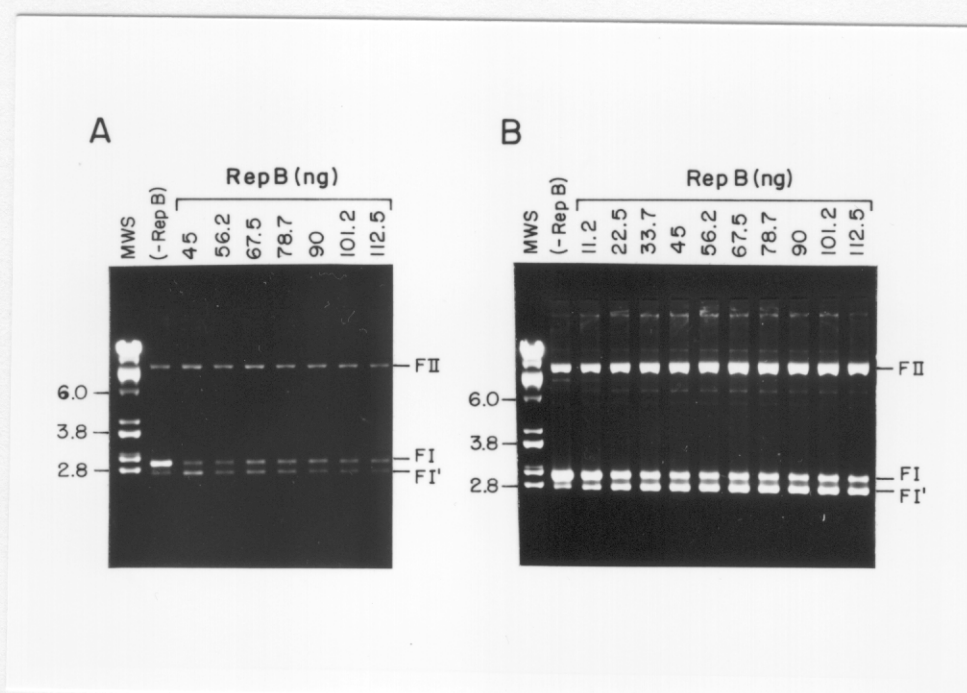
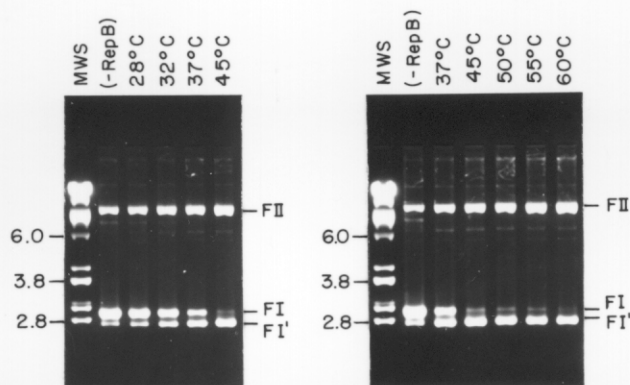


Figura 24. Efecto de la concentración de RepB en su actividad sobre DNA sustrato superenrollado. Gel A. Ensayo de actividad sobre 232 ng de DNA de pMV158 y las siguientes concentraciones de RepB: 45, 56.2, 67.5, 78.7, 90, 101.2, 112.5 ng. Gel B. Ensayo de actividad sobre 700 ng de DNA de pMV158 y las siguientes cantidades de RepB: 11.2, 22.5, 33.7, 45, 56.2, 67.5, 78.7, 90, 101.2, 112.5 ng. Las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C y los productos de reacción se analizaron en geles de agarosa al 1%, en tampón TBE con 0.5 µg/ml de EtBr. FI: forma superenrollada; FII: forma circular abierta; FI': forma circular cerrada y relajada; MWS: marcadores de peso molecular.

7.4. Temperatura de incubación. Se prepararon varias muestras con DNA de pMV158 (700 ng), tampón B, 20 mM MnCl₂ y 45 ng de RepB. Las muestras se incubaron durante 30 min a temperaturas comprendidas entre 28 y 60°C, y las reacciones se

pararon como en los ensayos anteriores. Los productos de reacción se analizaron en un gel de agarosa al 1% en tampón TBE con 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de EtBr y se calculó el porcentaje de actividad de RepB a las temperaturas indicadas (Fig. 25). Los mayores porcentajes de formas FII + FI' se obtuvieron a temperaturas superiores a los 45°C. Para ensayos posteriores, se eligieron las temperaturas de 37, 45 y 60°C.

A



B

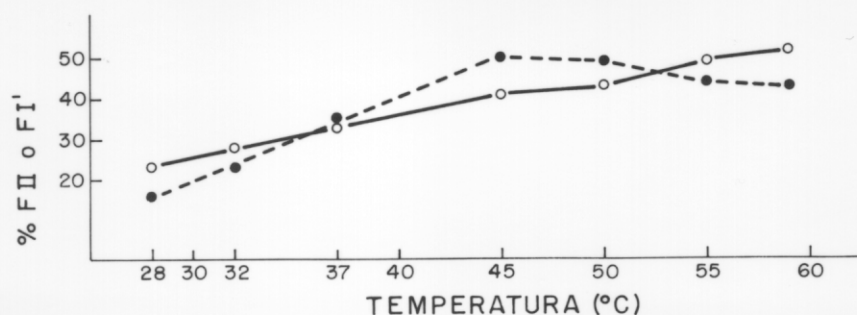


Figura 25. Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad de RepB en DNA superenrollado. **A.** Ensayos de actividad: 700 ng de DNA de pMV158 se incubaron con 45 ng de RepB durante 30 min a las siguientes temperaturas: 28, 32, 37, 45, 50, 55 y 60°C. Los productos de reacción se analizaron en geles de agarosa al 1%, en tampón TBE y 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de EtBr. **B.** Representación gráfica de los productos de reacción generados por RepB [FII (O) o FI' (●)] para cada una de las temperaturas ensayadas.

7.5. Influencia de la concentración de KCl en el tampón de incubación sobre la actividad de RepB. En este caso, DNA de pLS1 (420 ng) se trató con 27 ng de RepB en presencia de 20 mM MnCl_2 y tampón B suplementado con distintas concentraciones de KCl (de 0.1 a 0.5 M). Las muestras se prepararon por triplicado

y fueron incubadas durante 30 min a las temperaturas de 37, 45 y 60°C. Los productos de reacción se analizaron mediante electroforesis y se calcularon los porcentajes de formas FII + FI' obtenidos en cada caso. Como el KCl puede generar inespecíficamente formas FII, se prepararon muestras con las distintas concentraciones de KCl, que no fueron tratadas con la proteína, pero sí se incubaron durante el mismo tiempo a las temperaturas indicadas. Se observó que la actividad de cierre de RepB se inhibe a concentraciones de KCl entre 250 y 300 mM (Fig. 26). En presencia de KCl aparecen formas FII inespecíficas, que van en aumento hasta alcanzar una concentración de KCl de 300 mM.

7.6. Influencia de cationes en la actividad de RepB. Se realizó un ensayo con 700 ng de DNA de pMV158 y 45 ng de RepB, en tampón B suplementado con 20 mM MnCl_2 o con 20 mM MgCl_2 . Las muestras se incubaron 30 min a 60°C y las reacciones se pararon con proteinasa K. RepB no presentó actividad detectable de corte/cierre en presencia de 20 mM MgCl_2 . En un ensayo distinto se probaron tres concentraciones de MnCl_2 (5, 20 y 50 mM) mezclando la proteína (18 ng) con tampón B y el catión durante 5 min a t.a., precalentando o no a tiempos cortos a 60°C. Las reacciones se iniciaron por adición de DNA de pMV158 (280 ng) y se incubaron 5 min a 60°C (ver apartado de tiempos de reacción). Sólo se observó algo de actividad en las muestras precalentadas 15 y 30 segundos a 60°C, con 20 mM de MnCl_2 . La proteína RepB en ausencia de MnCl_2 no manifiesta actividad de corte/cierre sobre DNA plasmídico. Otros cationes ensayados (Ca^{2+} , Zn^{2+}) no mostraron influencia alguna en la actividad de RepB (resultados no mostrados).

7.7. Actividad de RepB en presencia de camptotecina. La camptotecina es un inhibidor específico de la topoisomerasa I eucariótica. Su acción se ejerce estabilizando las formas OC (circulares abiertas o FII) unidas a proteína (Hsiang *et al*, 1985; Avemann *et al*, 1988), con lo cual impide que la topoisomerasa I pueda completar su acción y cerrar la molécula. Como RepB presenta una actividad de corte/cierre similar a la que realiza la topoisomerasa I, se pensó que la camptotecina podría actuar de igual forma sobre ambas enzimas. Para comprobar esto, se realizó un ensayo de actividad de RepB (18 ng) sobre DNA de pLS1 (280 ng) en presencia de tres concentraciones de camptotecina (54, 108 y 216 μM). Además de los controles I (sin RepB) y II (sin

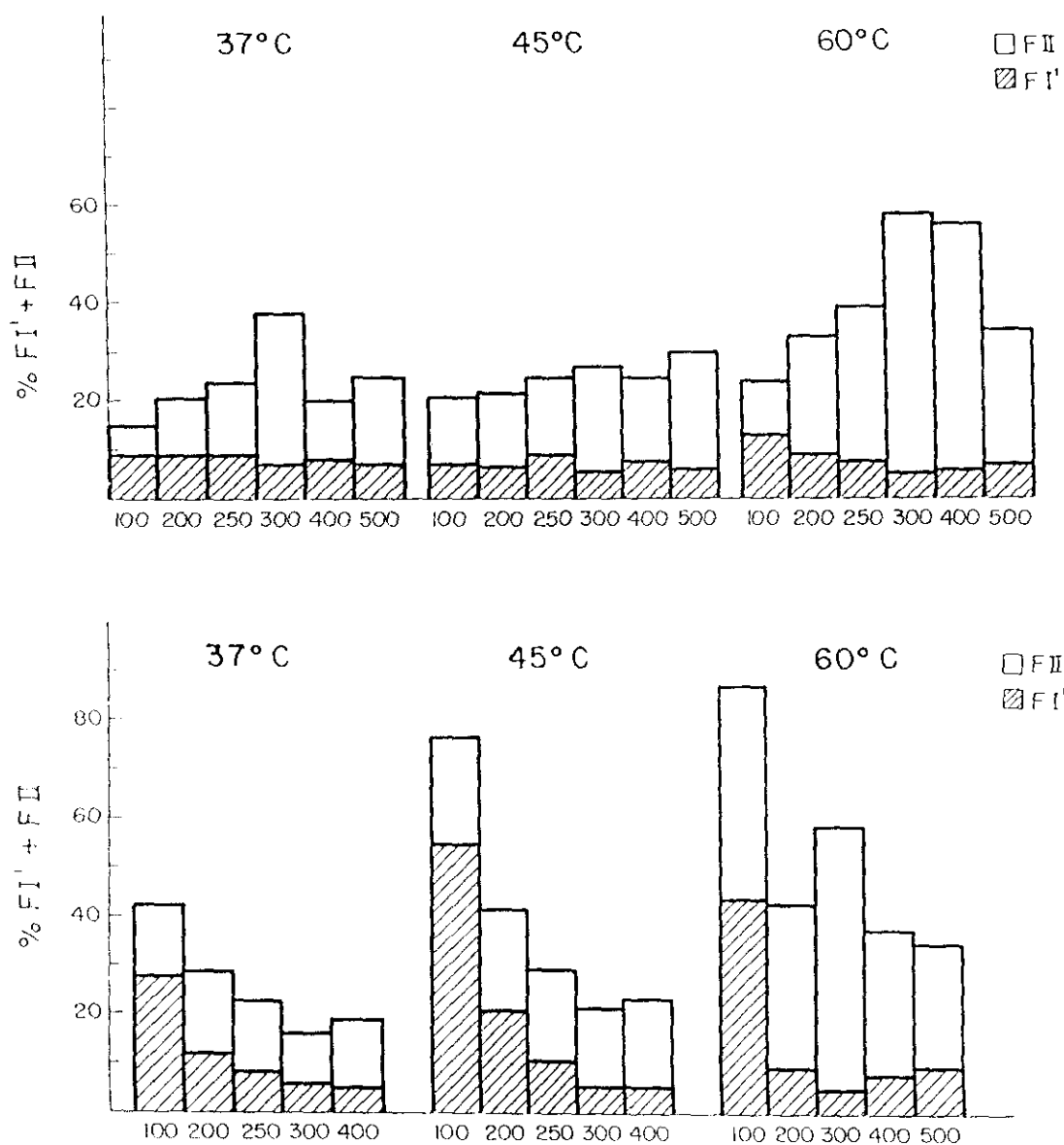


Figura 26. Efecto de la concentración de KCl presente en el tampón de reacción sobre la actividad de RepB. Para realizar este ensayo, se incubó DNA de pMV158 (700 ng) en presencia o ausencia de RepB (45 ng), durante 30 min a las temperaturas indicadas, en presencia de distintas concentraciones de KCl en el tampón de reacción: 100, 200, 250, 300, 400 y 500 mM. **Parte superior:** representación gráfica de los productos generados inespecíficamente tras 30 min de incubación en ausencia de RepB y con distintas concentraciones de KCl. **Parte inferior:** representación gráfica de los productos generados por RepB en presencia de distintas concentraciones de KCl. A cada temperatura se le restó el porcentaje correspondiente de formas FII' + FII, generadas inespecíficamente por la concentración de KCl presente en la reacción. FII: forma circular abierta (□); FII': forma cerrada y relajada (▨).

camptotecina y con RepB), se incluyó un control III (con RepB y DMSO al 8%) con el fin de analizar el efecto del DMSO, componente en el que se disuelve la camptotecina, sobre la actividad de RepB. Tras añadir la camptotecina o el DMSO a la mezcla de DNA, tampón B y 20 mM MnCl_2 , mantuvimos las muestras 10 min a t.a., antes de añadir la proteína RepB. Se realizó una incubación de 30 min a 45°C y se paró la reacción con 148 $\mu\text{g/ml}$ de proteinasa K. Tras analizar los resultados (no mostrados), se observó una mayor actividad de RepB en presencia de DMSO (disolvente usado para la camptotecina). Sin embargo, no se observó inhibición de la actividad de RepB por la camptotecina.

7.8. Actividad de RepB en presencia del represor transcripcional CopG. La proteína CopG es uno de los elementos que controlan la replicación del plásmido pLS1. Su acción se ejerce a nivel transcripcional reprimiendo el promotor P_{ori} que controla la transcripción de los genes *copG* y *repB* (del Solar *et al*, 1989). Los datos derivados de "footprinting" con DNasa I y con radical hidroxilo empleando CopG pura, mostraron que las regiones protegidas por CopG no solapan con las regiones protegidas por RepB, aunque ambas regiones están contiguas (Fig. 27A; del Solar *et al*, 1990; de la Campa *et al*, 1990). Para conocer si CopG tiene algún efecto sobre la actividad *in vitro* de RepB, se realizó un ensayo con DNA de pLS1 (700 ng), RepB (45 ng) y tres concentraciones de CopG (3.6, 7 y 14 ng). En el experimento se incluyeron tres controles: control I (DNA en ausencia de las dos proteínas), control II (sólo en presencia de CopG) y control III (sólo en presencia de RepB). A las muestras tratadas con la proteína CopG se les mantuvo durante 10 min a t.a., antes de iniciar la reacción con la adición de MnCl_2 y RepB. Las muestras tratadas con CopG y RepB se prepararon por triplicado y se incubaron a 37, 45 y 60°C durante 30 min. La incubación de los controles I y II se realizó a 37°C y la del control III fue a 45°C. Tras el análisis de los productos de reacción, se observó que la actividad de RepB no se modifica en mayor o menor medida por la presencia de CopG. Sí se observó una débil banda correspondiente a formas lineales y un ligero aumento de formas FII, que podrían atribuirse a la existencia de una posible nucleasa contaminante en la preparación de la proteína CopG (Fig. 27B). En otros ensayos realizados en nuestro laboratorio, no se ha observado influencia de RepB sobre la unión de CopG a su diana. Podemos concluir que, en las condiciones ensayadas, no parece existir

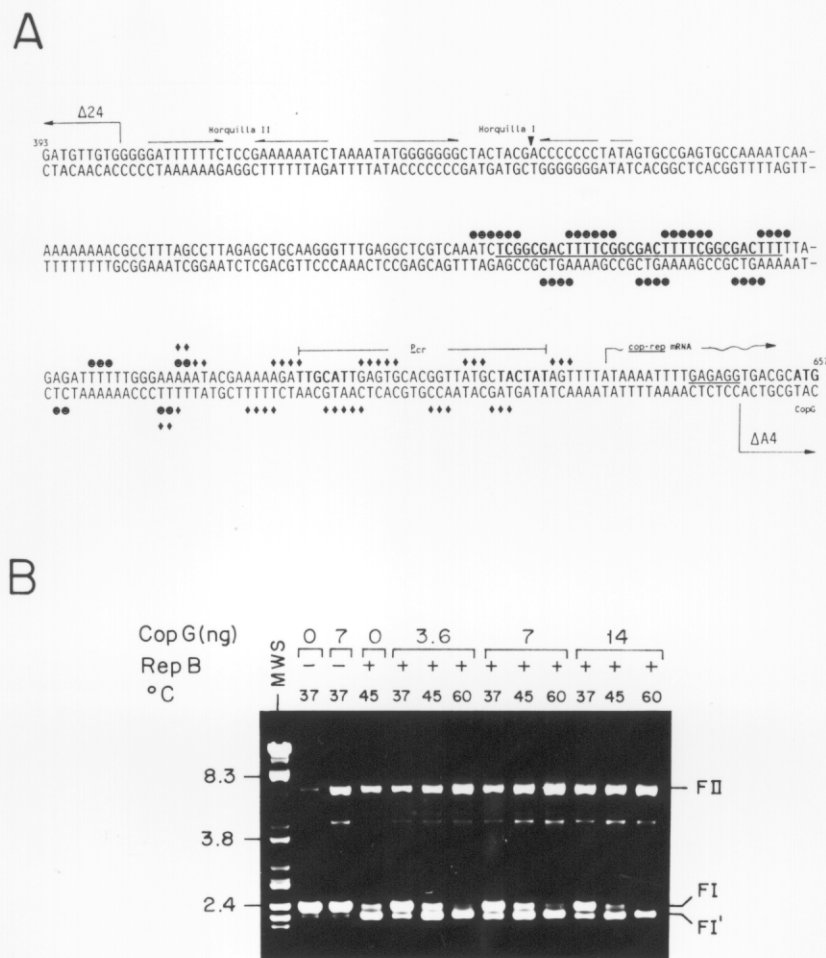


Figura 27. Actividad de RepB en presencia del represor transcripcional CopG. **A.** Secuencia de nucleótidos del origen funcional (*dso*) de pLS1 donde se muestran los bordes a la derecha e izquierda de las deleciones $\Delta 24$ y $\Delta A4$. Los "footprints" generados por RepB (\odot) y CopG (\diamond), determinado sobre dsDNA, se indican en las dos hebras del DNA. Además, se muestran las Horquillas I y II, que contiene el sitio de corte (∇) de la proteína RepB, las tres repeticiones directas (en negrita y subrayado), el promotor *cop-rep* (P_{cr}), el punto de iniciación del mRNA *cop-rep* (\rightarrow) y el primer codón del gen *copG* (en negrita). **B.** DNA de pLS1 (700 ng) se incubó en presencia de RepB (45 ng) y tres concentraciones de CopG (3.6, 7 y 14 ng). Se incluyeron tres controles: control I (DNA en ausencia de las dos proteínas), control II (sólo en presencia de CopG) y control III (sólo en presencia de RepB). A las muestras tratadas con la proteína CopG se les mantuvo durante 10 min a t.a. antes de iniciar la reacción con la adición de $MnCl_2$ y RepB. Las muestras tratadas con CopG y RepB se prepararon por triplicado y se incubaron a 37, 45 y 60 °C durante 30 min. La incubación de los controles I y II se realizó a 37 °C y la del control III fue a 45 °C. FI: forma superenrollada; FII: forma circular abierta; FI': forma circular relajada; MWS: marcadores de peso molecular.

influencia de CopG sobre la actividad de RepB, y que la contigüidad de las regiones de unión de ambas proteínas no supone un impedimento estérico para la unión a sus dianas.

7.9. Actividad de RepB en presencia de nicotinamín-mononucleótido (β -NMN). La actividad de RepB sobre DNA plasmídico específico da lugar a formas FII y FI' (tras su actividad de corte y corte/cierre, respectivamente). Como en las muestras no tratadas con RepB se observó una pequeña cantidad de estas formas, había que descartar la posibilidad de la existencia de una DNA ligasa adenilada contaminante en la preparación de RepB, que podría haber llevado a cabo la reacción de cierre (Lehman, 1974; Kornberg y Baker, 1992). Para ello, se incubó DNA de pMV158 (700 ng) con varias cantidades de β -NMN (0.5, 5 y 500 μ M) en presencia o ausencia de RepB (45 ng), durante 30 min a las temperaturas de 37, 45 y 60°C. La reacción se paró con 125 μ g/ml de proteinasa K. Tras analizar los productos de reacción mediante

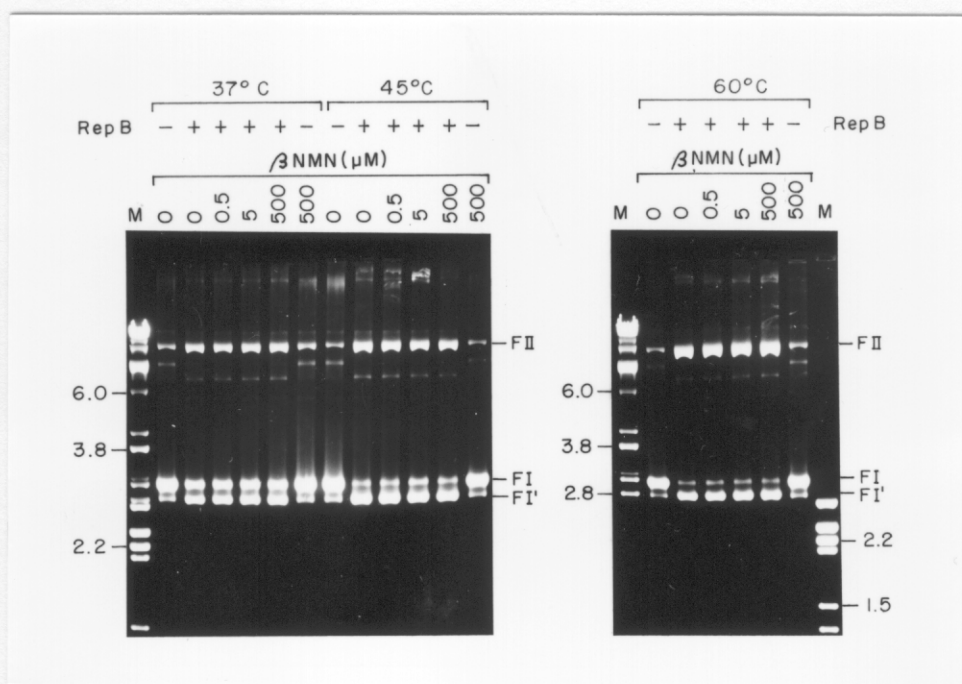


Figura 28. Actividad de RepB en presencia de β -NMN. DNA superenrollado de pMV158 (700 ng) se incubó o no con 45 ng de proteína RepB (relación en moléculas DNA:proteína igual a 9.5:1), en presencia o ausencia de las cantidades indicadas de β -NMN (0.5, 5 y 500 μ M), durante 30 min a las temperaturas de 37, 45 y 60°C. Los productos de reacción se analizaron en geles de agarosa al 1%, en tampón TBE y 0.5 μ g/ml de EtBr. Las formas de DNA plasmídico son: superenrollada (FI), circular abierta (FII) y circular relajada (FI'). Los signos (+) y (-) indican la presencia o ausencia de proteína en las muestras. M: marcadores de peso molecular.

electroforesis, no se observó ninguna influencia del β -NMN sobre la actividad de RepB (Fig. 28). Por tanto, podemos descartar la existencia de una DNA ligasa adenilada contaminante en la preparación de RepB y se concluye que RepB, por sí sola, es capaz de cortar y resellar el DNA plasmídico de pMV158.

7.10. Actividad de RepB en presencia de detergentes. A la vista de los resultados obtenidos mediante equilibrio de sedimentación, pareció interesante emplear algún detergente capaz de disociar agregados de RepB. Para este ensayo se utilizaron dos detergentes no iónicos: Tween 20 (CMC= 0.059 mM) y octil- β -D-glucopiranosido (CMC= 19-25 mM) a concentraciones 10 y 20 veces por debajo del valor de su concentración micelar crítica (CMC). Se mezcló DNA de pMV158 (350 ng) con RepB (111 ng; proteína de la segunda purificación realizada) en presencia de tampón B, 20 mM $MnCl_2$ y el detergente correspondiente. Se realizó una incubación de 30 min a 60°C y se procedió como de costumbre. El análisis electroforético reveló un aumento de la actividad de RepB en presencia de octil- β -D-glucopiranosido a las dos concentraciones utilizadas y con la mayor concentración de Tween 20 (con la concentración más baja se obtuvo menos actividad que el control sin detergente). Se observó una desaparición prácticamente total de las formas FI y un aumento de las formas FII, mientras que la banda correspondiente a formas FI' se mantenía como en el control. Por tanto, el aumento de actividad observado era producto de la actividad de corte de RepB, mientras que la actividad de cierre resultó inhibida por los detergentes. Se incluyeron dos controles sin proteína en presencia o no de detergente, para comprobar así que el detergente no tenía ningún efecto sobre el DNA y que la actividad observada en las muestras era específica de RepB.

7.11. Cinéticas de la actividad de RepB. La primera cinética de actividad de RepB se realizó con DNA de pMV158 (700 ng) en tampón B, con 20 mM $MnCl_2$ y 45 ng de proteína a 60°C (se eligió esta temperatura de incubación ya que RepB presenta un mayor porcentaje de actividad a 60°C). Los tiempos de incubación a 60°C de las distintas muestras fueron los siguientes: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min. La reacción se paró con 125 μ g/ml de proteinasa K. Los resultados mostraron que a los 5 min de incubación a 60°C, la proteína ya había actuado sobre la casi totalidad del DNA. Por ello, se realizaron nuevos ensayos a tiempos de incubación más cortos. Se realizó una

segunda cinética partiendo de una mezcla única de DNA de pMV158, tampón B, MnCl_2 y RepB, que se repartió en diez tubos. Los tiempos de incubación a 60°C fueron: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 15, 25 y 35 min. Las reacciones se pararon como la vez anterior. A las muestras se les añadió el tampón de carga y se analizaron como de costumbre, realizándose los cálculos densitométricos de los productos de reacción. Con tan sólo 1 min de incubación a 60°C, el porcentaje de formas FII + FI', producto de la actividad de RepB, superaba el 85%; alcanzándose un 95% a los 15 min de incubación (Fig. 29A). Finalmente, se realizó otra cinética a tiempos de incubación aún más cortos: 5, 15, 30, 45, 60 y 120 segundos, y 5, 10 y 30 min. La cantidad de DNA de pMV158 y RepB fue la misma que en ocasiones anteriores. La reacción se inició añadiendo la proteína por separado en cada una de las muestras de 30 μl . La reacción se paró a 4°C con 4 μl de una solución STOP (0.2% xilencianol, 0.2% azul de bromofenol, 57% glicerol, 9.5 mM EDTA y 1.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteinasa K). El análisis de los productos de reacción mostró un 62% de formas FII + FI' a tan sólo 30 segundos de incubación a 60°C. Posteriormente, se realizaron cinéticas a las temperaturas de 37 y 45°C, con menores cantidades de RepB (9 y 22.5 ng) y con otros derivados de pMV158 (estos resultados se comentarán más adelante).

7.12. Otros parámetros. Tras el óptimo resultado obtenido con RepB a los 5 min de incubación a 60°C, se realizó una prueba con DNA de pMV158 (700 ng) y distintas concentraciones de la proteína: 9, 18, 27, 36 y 45 ng. Los resultados mostraron que con sólo 18 ng de proteína y 5 min de incubación a 60°C, se alcanza un valor próximo al 90% de formas FII + FI' (Fig. 29B).

Como la actividad de RepB se manifiesta a 60°C, y a tiempos de incubación muy cortos, se realizaron una serie de ensayos para conocer la termoestabilidad de la proteína. En primer lugar, se preincubó RepB a 37, 45 y 60°C, durante distintos tiempos (30, 60, 120, 180, 240 y 300 segundos). En el caso de preincubación a 60°C se ensayaron también tiempos mayores de preincubación (10, 15, 20, 25 y 30 min). Con estas muestras de proteína, se realizaron ensayos de actividad de RepB sobre DNA de pMV158 (280 ng), en tampón B, 20 mM MnCl_2 y 18 ng de la proteína RepB precalentada (volumen final, 10 μl). Las reacciones se mantuvieron 5 min a las temperaturas indicadas, y se pararon con 1.5 μl de la solución STOP. El análisis de los productos de reacción no permitió observar actividad detectable en las muestras

tratadas con RepB preincubada a 45 y 60°C. La muestra preincubada a 37°C mostró una actividad de RepB similar a la del control. No obstante, una incubación de 5 min a esta temperatura manifiesta un porcentaje de actividad muy bajo. Posteriormente, se repitió el ensayo, precalentando la proteína con DNA y tampón B durante 30, 60, 120, 180, 240 y 300 segundos, e iniciando la reacción con el MnCl_2 . De nuevo, no se observó ninguna actividad de RepB tras su precalentamiento. Una posibilidad para explicar la inactivación de RepB en sólo con 30 segundos de preincubación a 45 y 60°C podría ser que el plegamiento de la proteína a esta temperatura afectara al dominio de unión a DNA.

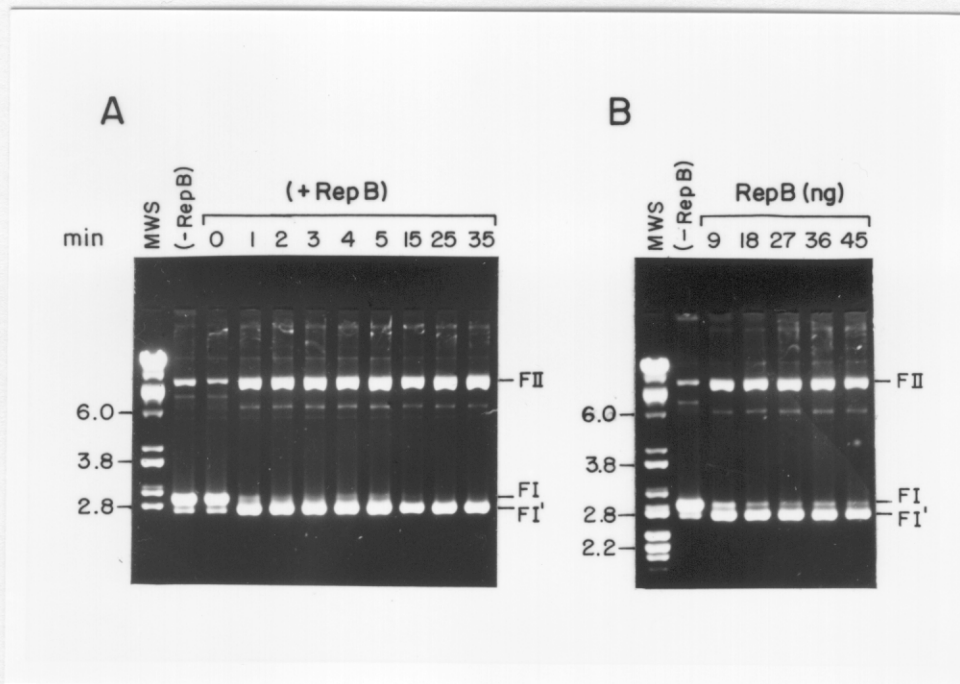


Figura 29. Variación del tiempo de incubación en la actividad de la proteína RepB. **Gel A.** DNA de pMV158 (700 ng) se incubó con la proteína RepB (45 ng) a 60°C, durante los siguientes tiempos: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 15, 25 y 35 min. **Gel B.** DNA de pMV158 (700 ng) se incubó durante 5 min a 60°C, con distintas concentraciones de proteína: 9, 18, 27, 36 y 45 ng. En ambos ensayos, los productos de reacción se analizaron en geles de agarosa al 1%, en tampón TBE y 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de EtBr. FI: forma superenrollada; FII: forma circular abierta; FI': forma circular relajada; MWS: marcadores de peso molecular.

A continuación, se realizó otra prueba precalentando la proteína a 60°C junto con tampón B y MnCl_2 durante 30, 60, 180 y 300 segundos. En esta ocasión, las reacciones se iniciaron con la adición de DNA plasmídico y, como en los casos anteriores, se realizó una incubación de 5 min a 60°C. Los resultados mostraron que la muestra de

RepB, preincubada con MnCl_2 durante 30 segundos, presentaba actividad residual, por lo que los siguientes ensayos se efectuaron a tiempos más cortos (preincubación de 15, 30, 45, 60, 150 y 300 segundos). RepB manifestó cierto porcentaje de actividad en las muestras preincubadas 15 y 30 segundos. Pensamos que, quizás, el MnCl_2 podría estabilizar la proteína, prolongando su vida media. Por ello, se realizó un experimento con tres concentraciones de MnCl_2 : 5, 20 y 50 mM. Las mezclas de reacción (tampón B, MnCl_2 y RepB) se mantuvieron durante 5 min a t.a., tras los cuales se realizó un precalentamiento de 15, 30 y 45 segundos a 60°C. De nuevo en este caso, las reacciones se iniciaron con la adición de DNA y se incubó durante 5 min a 60°C. Tras el análisis de los resultados sólo se observó actividad en las muestras de RepB precalentadas 15, 30 y 45 segundos a 60°C junto con el tampón B y 20 mM MnCl_2 . Resultó sorprendente el comprobar que los controles no precalentados (mantenidos 5 min a t.a.) no funcionaron a ninguna de las concentraciones de MnCl_2 ensayadas. En cualquier caso, RepB parece tener una vida media muy pequeña: con sólo 5 min a t.a. en presencia de DNA y MnCl_2 pierde totalmente su actividad. Curiosamente, si se incubaba la proteína 5 min a t.a. (en presencia de MnCl_2 y tampón), se realiza un precalentamiento de 15 o 30 segundos a 60°C y se añade el DNA a la mezcla, RepB conserva cierta actividad. Por otra parte, si se precalienta el DNA con la proteína, y se inicia la reacción con MnCl_2 , RepB no presenta actividad. Además, si a la misma mezcla (previamente mantenida 5 min a t.a.) se le añade el DNA y se incubaba directamente (sin precalentamiento), RepB no actúa. El MnCl_2 parece contribuir a la estabilidad de RepB, ya que las únicas muestras precalentadas a 60°C que presentaron actividad fueron aquellas en las que el precalentamiento de la proteína se realizó en presencia de MnCl_2 . Pensamos que la presencia de MnCl_2 podría estabilizar a RepB frente al calor, o bien que podría facilitar la disgregación proteica y aumentar la velocidad de catálisis de la reacción. El MnCl_2 podría modificar la estructura de la proteína, estabilizando su centro activo. Recientemente, se ha postulado que los iones Mg^{2+} podrían estabilizar la forma dimérica de la proteína RepD, modulando la interacción con el origen y por tanto, la eficiencia de replicación (Thomas *et al*, 1995).

Como ha quedado mostrado, el porcentaje de formas FII + FI' alcanzó hasta el 95%, tras una incubación de 30 min a 60°C con DNA de pMV158, en una relación

DNA:proteína en moléculas de 1:9.5. Sin embargo, en ninguno de los ensayos realizados con la proteína se consiguió un 100% de formas FI' (producto de la actividad de corte/cierre de RepB). Por ello, se realizaron distintas pruebas añadiendo sucesivas cantidades de proteína o variando la temperatura de incubación. Los ensayos se realizaron del modo siguiente: muestras de DNA de pMV158 (234 ng) se trataron con 15 ng de RepB y se incubaron 30 min a 45°C. Tras este tiempo, se volvió a añadir más proteína (15 ng) y se realizó una segunda incubación de 30 min a 45°C. Observamos que RepB se va inactivando tras los primeros 30 min de incubación a 45°C y que la adición de proteína nueva resulta en una subsiguiente disminución de las formas FI pero no de las formas FII. En otros ensayos, las muestras se incubaron 30 min a 60°C, al cabo de los cuales se realizó una segunda incubación de 30 min a 45°C. De nuevo no se observó disminución de las formas FII. Como control, se incluyó una muestra con RepB en ausencia de $MnCl_2$ que fue incubada durante 30 min a 45°C; no se observó ninguna actividad de la proteína.

Por último, se realizó un nuevo ensayo incubando, a 60°C, DNA de pMV158 (1400 ng) con RepB (90 ng) en tampón B con 20 mM $MnCl_2$, en un volumen final de 50 μ l. Se tomaron muestras (5 μ l) de la reacción cada 5 min (hasta completar los 30 min de incubación), a las que se fueron añadiendo más cantidad de proteína, manteniendo constante la relación DNA/proteína (en masa) e igual a 15.5. Se incluyeron muestras control sin la adición de nueva cantidad de proteína. La reacción se paró a 4°C con 1 μ l de la mezcla STOP. Se pudo comprobar que al cabo de 30 min de incubación a 60°C, tras añadir un total de 410 ng de proteína todavía quedan formas FII en la muestra, sin contar por supuesto, los FII inespecíficos presentes en el control sin proteína. Por lo tanto, de esta serie de resultados, concluimos que no se ha conseguido desplazar el equilibrio entre corte (FII) y cierre (FI') hacia la reacción de cierre.

Este apartado de resultados nos ha permitido extraer las siguientes conclusiones: i) las mejores condiciones para el análisis electroforético de los productos de reacción de RepB, se consiguieron mediante geles de agarosa al 1%, en tampón TBE conteniendo 0.5 μ g/ml de EtBr; la electroforesis se realizó en cubetas horizontales largas, a voltajes bajos (30-40 V) y en tiempos largos de electroforesis (16-20 h); ii) el mayor porcentaje de actividad de la proteína RepB se obtuvo con una relación en

masa de DNA/proteína igual a 15.5, y en presencia de 20 mM de MnCl_2 ; iii) la actividad de RepB es dependiente de la temperatura; los mejores resultados se han obtenido incubando la proteína a 60°C; iv) se observó que debido a la presencia de KCl en el tampón de incubación, aparecen formas FII inespecíficas, y que la actividad de cierre de RepB se inhibe a concentraciones de KCl entre 250 y 300 mM; v) la actividad de RepB no se inhibe en presencia de camptotecina (inhibidor de la topoisomerasa I) y tampoco se ve afectada por la presencia del represor transcripcional, CopG; vi) se comprobó que la proteína RepB es capaz de cerrar aquellas moléculas de DNA que previamente ha cortado, sin que exista ninguna actividad DNA ligasa adenilada contaminante; vii) algunos detergentes podrían favorecer la actividad de corte de RepB, posiblemente debido a la disociación de agregados proteicos, pero inhiben la actividad de cierre; viii) RepB actúa rápido y parece tener una vida media muy pequeña; ix) el MnCl_2 podría modificar la estructura de la proteína, estabilizando su centro activo.

8. pLS1 PRESENTA UN INCREMENTO EN SU NÚMERO DE COPIAS EN CULTIVOS DE B.subtilis CRECIDOS A 45°C

Como en los experimentos realizados *in vitro*, se ha observado un aumento de la actividad de RepB a temperaturas de incubación superiores a la fisiológica (37°C), se pensó en la posibilidad de realizar un ensayo *in vivo* a esas temperaturas, con el fin de obtener información sobre la replicación del plásmido como consecuencia de la actividad de RepB, en unas condiciones cercanas a una situación "natural". Por ello, se aprovechó el hecho de que el plásmido pLS1 replica en la estirpe mesófila *B.subtilis* (Espinosa *et al*, 1982), para comparar el número de copias de pLS1 en esta estirpe cuando las células se crecen a 37, 45 o 50°C. Cultivos de *B.subtilis* MB11 que contenían el plásmido pLS1 se crecieron a las temperaturas de 37, 45, 50 y 55°C. Cuando la DO_{550} de los cultivos alcanzó el valor de 0.6, se tomaron alícuotas de 1.5 ml para analizar el contenido de DNA total (cromosómico y plasmídico). Distintas cantidades de las preparaciones de DNA total [10 μl (a), 15 μl (b) y 20 μl (c)] se analizaron en geles de agarosa al 1% en tampón TAE, que fueron teñidos con 1 $\mu\text{g/ml}$ de EtBr tras la electroforesis (Fig. 30). El cálculo del número de copias de

pLS1 se realizó a partir de la densitometría de los negativos obtenidos y tomando como referencia el número de copias de pLS1 en *B.subtilis* a 37°C, valor igual a 4 ± 1 que fue previamente determinado (Kramer *et al*, 1995). Como resultado se obtuvo un valor de 7.6 copias a 45°C y una disminución a 2.3 copias a 50°C; el cultivo a 55°C no creció y se observó una disminución en el tiempo de duplicación de la bacteria, cuando ésta se creció a 45 y 50°C. El cultivo de *B.subtilis*/pLS1 crecido a 45°C se creció durante 26 generaciones y se tomaron alícuotas a las 6, 16 y 26 generaciones para analizar el contenido de DNA plasmídico; se comprobó que el incremento en el número de copias de pLS1 se mantiene en las distintas generaciones de crecimiento. También se pudo observar que, a 50°C, las muestras analizadas que fueron tomadas a la misma densidad óptica presentaban una menor cantidad de DNA cromosómico.

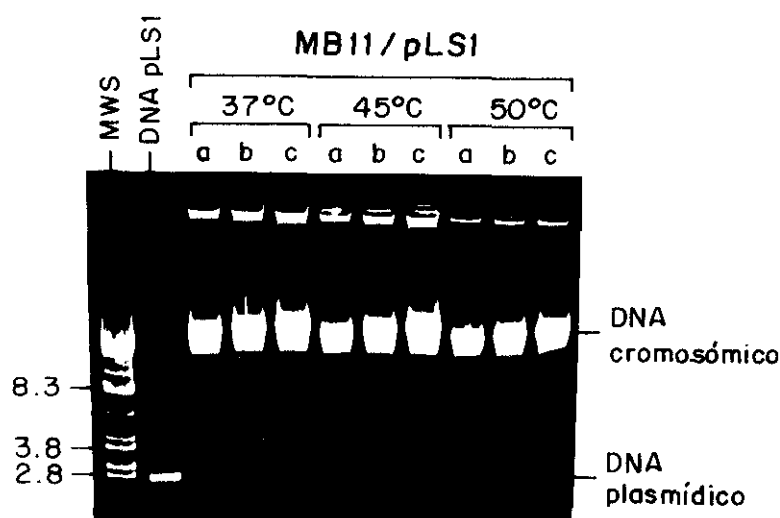


Figura 30. Número de copias de pLS1 en *B.subtilis* a temperaturas superiores a 37°C. Cultivos de *B.subtilis* MB11/pLS1 se crecieron a 37, 45 y 50°C hasta una $DO_{550} = 0.6$. Se analizó el contenido de DNA total, cargando distintas cantidades [10 μ l (a), 15 μ l (b) y 20 μ l (c)] en geles de agarosa al 1%, en tampón TAE que fueron teñidos con 1 μ g/ml de EtBr. El valor de N se calculó a partir de la densitometría de los negativos obtenidos. Como control se incluye una muestra con DNA de pLS1. MWS: marcador de peso molecular.

9. IN VITRO, LOS ITERONES NO SON NECESARIOS PARA LA ACTIVIDAD DE CORTE/CIERRE DE RepB SOBRE DNA SUPERENROLLADO

Para definir las interacciones RepB-*dso* sobre DNA plasmídico superenrollado, se utilizaron plásmidos recombinantes (basados en el vector pC194) que llevan clonados la región *nic* (pCGA7/8), *bind* (pCGA3) o el *dso* entero (pCGA11/12) de pLS1. En el Apartado 2 se mostró que solamente pCGA11 y pCGA12 exhiben una ligera incompatibilidad hacia pLS1, probablemente debida a utilización de RepB. Esto sugería que RepB necesita, *in vivo*, un *dso* entero para llevar a cabo su función de proteína iniciadora de la replicación. Para saber si los requerimientos *in vitro* eran semejantes a los observados *in vivo*, se incubó DNA de los plásmidos mencionados (700 ng) con la proteína RepB (45 ng) en tampón B y 20 mM MnCl₂, durante 30 min a 37, 45 y 60°C. También se incluyó DNA del vector pC194 como control negativo. La reacción se paró con 125 µg/ml de proteinasa K, y las muestras se analizaron mediante electroforesis (Fig. 31). Como se esperaba, RepB no presentó ninguna actividad sobre pC194 ni sobre pCGA3 (que sólo contiene los iterones). Esto demuestra la especificidad de RepB sobre la región *nic* del *dso* de pLS1. Se observó, además, que RepB presentaba actividades similares sobre DNA de pCGA11/12 (con el origen entero) y sobre pCGA7/8 (carentes de la región *bind* del origen). Tampoco se observó ninguna diferencia de actividad entre las dos orientaciones utilizadas. Por tanto, se puede concluir que, *in vitro*, la relajación de DNA superenrollado por RepB no requiere la unión previa de la proteína iniciadora a los iterones, y que la actividad de RepB es dependiente de hebra pero independiente de orientación sobre DNA superenrollado.

Basándonos en los datos de Bowater *et al* (1991) sobre las propiedades de las secuencias ricas en (A+T) para promover la extrusión de estructuras cruciformes a baja fuerza iónica en plásmidos superenrollados, se intentó favorecer *in vitro* la extrusión de H-I (que contiene la región *nic* del *dso* de pLS1), ya que la frecuencia y distribución de nt alrededor de la región *nic* muestra que la región rica en (G+C) alrededor del sitio de corte (entre los nt 448 y 449) de RepB se encuentra flanqueada

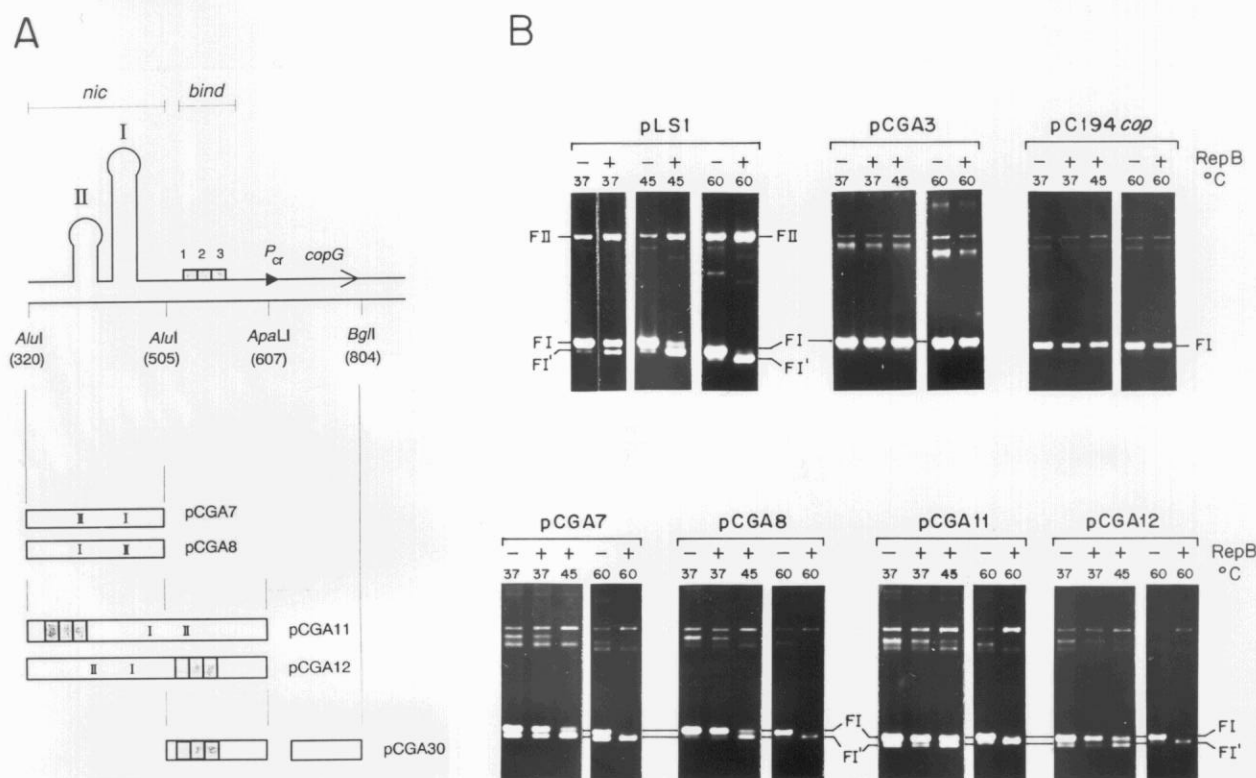


Figura 31. Requerimientos estructurales *in vitro* de la proteína RepB sobre DNA superenrollado. **A.** Mapa físico y funcional de los fragmentos de pLS1 clonados en el sitio único *HindIII* de pC194*cop*. Se indican las posiciones de las Horquillas I y II, los iterones (1-2-3, cajas sombreadas), el promotor P_{cr} (►) para la transcripción de los genes *copG* y *repB*, y el gen *copG* (flecha). Se muestran los sitios de restricción relevantes usados para el clonaje (coordenadas de corte en pLS1 entre paréntesis), así como los nombres y orientaciones de los recombinantes. **B.** Geles de agarosa con los productos de reacción DNA-RepB a 37, 45 y 60 °C. Los ensayos se realizaron con 700 ng de DNA plasmídico (pLS1, pCGA30, pC194*cop*, pCGA7/8 y pCGA11/12) y 45 ng de RepB; la incubación fue de 30 min a 60 °C. Los signos (+) y (-) indican la presencia o no de la proteína RepB en la reacción. FI: forma superenrollada; FII: forma circular abierta; FI': forma circular relajada.

por secuencias ricas en (A+T) (ver Fig. 75 en Discusión). Se emplearon DNAs de los plásmidos pCGA7, pCGA11 y pLS1, realizando un precalentamiento del DNA (2.1 μ g) en agua durante 15 min a 45 ó 60 °C (para abrir las zonas del DNA ricas en A+T) y después se enfrió rápidamente a 0 °C para intentar "congelar" las estructuras secundarias extruidas. Los DNAs se mantuvieron a 0 °C durante 10 min, antes de aumentar la concentración de sal de las muestras por adición de tampón B y 20 mM

MnCl₂, hasta un volumen final de 100 μ l. Un tercio de este volumen (700 ng) se incubó con RepB (45 ng) durante 30 min a 30°C, los otros dos tercios restantes se incubaron a 37°C en presencia o no de la proteína. Tras la incubación, las reacciones se trataron con 125 μ g/ml de proteinasa K (10 min a 20°C). Se incluyeron muestras que fueron incubadas con RepB sin ningún tratamiento previo del DNA (controles positivos) y como control negativo se utilizó el plásmido pCGA3 (que sólo contiene la región *bind* del origen). Los productos de reacción se analizaron como de costumbre. En estas condiciones no se pudo observar ninguna actividad de RepB a 30°C en los plásmidos pCGA7 y pCGA11, aunque sí hubo cierta actividad sobre el pLS1 a esta temperatura (no mostrado). A 37°C no se observó ningún incremento en la actividad de RepB sobre los plásmidos ensayados; quizás porque en estos plásmidos se necesita una temperatura mayor de precalentamiento para poder abrir la zona que rodea a H-I y lograr después mantener esta estructura con una bajada más rápida de la temperatura.

Dado que los iterones no son esenciales para la actividad *in vitro* de RepB, se diseñaron algunos experimentos para intentar definir su papel *in vivo*. En primer lugar, intentamos eliminar los iterones de pLS1 para conocer el efecto de tal delección sobre la replicación del plásmido. Para facilitar la delección de los iterones, éstos se flanquearon por dos sitios de restricción, generados por mutagénesis dirigida. Se utilizó el plásmido pALT-*Pst*Ib (que lleva clonado el fragmento *Pst*I B de pLS1 en el fagémido pALTER-1; Tabla 3) para crear los sitios *Bam*HI (5'-G'GATCC-3'; cambios C→A y G→C en las coordenadas 522 y 525 de pLS1) y *Bgl*II (5'-A'GATCT-3'; cambio T→C en la coordenada 574 de pLS1) a la izquierda y derecha de los iterones, respectivamente. Estas dianas no existen en pLS1. Se infectó el cultivo JM109/pALT-*Pst*Ib con el fago R408 para la obtención de ssDNA, usando una m.o.i. de 10. El DNA del fago junto con el DNA del fagémido recombinante se coprecipitaron según las indicaciones de Maniatis *et al* (1982). La mutagénesis se llevó a cabo anillando 0.1 pmol de ssDNA con 0.5 pmol del oligo reparador de Ap fosforilado y 2.5 pmol de los oligos mutagénicos *Bam*HIcomp (34-mer; 5'-GTCGCCGAGATTTGAGGATCCTC AAACCCTTGCA-3') y/o *Bgl*IIcomp (31-mer; 5'-GTATTTTCCCAAAGATCTC TAAAAAGTCG-3') fosforilados en su extremo 5'-terminal con la T4 PNK (Fig. 32A). La reacción de síntesis se realizó con la T4 DNA polimerasa y se selló con T4 DNA ligasa, tras una incubación de 90 min a 37°C. Con el DNA así sintetizado se

transformó BMH71-18*mutS* (Hanahan, 1983). Se seleccionaron los transformantes Ap^r, de los que se preparó DNA plasmídico para transformar la estirpe JM109, seleccionando para crecimiento en presencia de Ap. Finalmente, se comprobó la presencia de las mutaciones deseadas mediante digestión con los enzimas adecuados. De esta forma, se obtuvieron los plásmidos pALT-*Bam*HI (sitio *Bam*HI en la coordenada 520 del fragmento de pLS1 clonado en pALT-*Pst*Ib), pALT-*Bgl*II (sitio único *Bgl*II en la coordenada 570) y pALT-*BB* (sitios *Bam*HI y *Bgl*II).



Figura 32. Secuencia de nucleótidos de pLS1 desde las coordenadas 400 a 600, que incluyen la región del *dso* de pLS1. Se indica la Horquilla I con el sitio de corte de RepB (/) y los tres iterones (I1-I3; en *itálica* y subrayado). Se muestran los oligos mutagénicos empleados para crear los sitios de restricción *Bam*HI y *Bgl*II, a la izquierda y derecha de los iterones respectivamente; y los cambios de nucleótidos introducidos (en *negrita*).

Para intentar construir los derivados de pLS1 con las mutaciones indicadas, se aisló el fragmento *Pst*I B (clonado en pALTER-1), y se realizó un intercambio de fragmentos *Pst*I con el replicón pLS1: fragmentos *Pst*I B (1056 pb) de los derivados de pALTER-1 conteniendo las mutaciones y el fragmento *Pst*I A (3357 pb) de pLS1, en una relación A:B igual a 1.5:1. Los fragmentos se trataron con T4 DNA ligasa en un volumen de 25 μ l, durante 16 h a 16°C. Se transformó *S.pneumoniae* 708 con la mitad de cada ligación y se seleccionaron los transformantes por crecimiento en medio sólido con Tc, obteniéndose los siguientes transformantes/ml: 1320 para la construcción pLS1*Bam*HI, 860 para la construcción pLS1*Bgl*II y 1870 para el mutante doble pLS1*Bam*HI-*Bgl*II. Se seleccionaron varios clones y se comprobó la existencia de las mutaciones mediante digestión con los enzimas de restricción correspondientes. Se escogió un clon de cada construcción, se obtuvo el DNA correspondiente y se volvió a transformar *S.pneumoniae* 708 para eliminar cualquier posible contaminación con pLS1 parental. Se analizaron varios clones y de nuevo se comprobó la existencia de la mutación deseada. Se obtuvieron así los plásmidos pLS1-520 (sitio único *Bam*HI en la coordenada 520 de pLS1), pLS1-570 (sitio único *Bgl*II en la coordenada 570) y pLS1BB (doble mutante con los sitios únicos *Bam*HI y *Bgl*II, en las coordenadas 520 y 570, respectivamente).

Para intentar la construcción del derivado de pLS1 sin iterones se utilizó pLS1BB, digiriendo DNA de este plásmido con *Bam*HI y con *Bgl*II, lo que genera extremos 5' compatibles que resultan en un nuevo sitio *Sau*3AI. El fragmento mayor se purificó y se procedió a su autoligación en un volumen de 35 μ l. La mitad de la ligación se utilizó para transformar *S.pneumoniae* 708, seleccionándose los transformantes por crecimiento en medio con Tc. Se obtuvieron 690 transformantes/ml, de los cuales se analizaron 48. Todos los clones analizados seguían manteniendo el sitio *Bgl*II. Por lo tanto, se dializó el resto de la ligación frente a TE (10:1) y se digirió con *Bgl*II para reducir los escapes que pudieran existir y bajar así la eficiencia de transformación de los fragmentos que no hayan ligado *Bam*HI-*Bgl*II. Nuevamente, se transformó *S.pneumoniae* 708 y se seleccionaron los transformantes Tc'. En este caso, se obtuvieron muy pocos transformantes (13 transformantes/ml). Tras ser analizados todos ellos, se observó que ninguno tenía los sitios *Bam*HI y *Bgl*II, pero cabía la posibilidad de que se tratara de un pLS1 silvestre. Por ello, se realizó una digestión

con *Sau3AI* (la ligación *Bam*HI-*Bgl*II genera un sitio nuevo) de los DNAs de todos los clones seleccionados y de pLS1 silvestre como control. Todos los DNAs carecían de un nuevo sitio *Sau3AI*, por lo que suponemos que se tratan de pLS1 silvestre. Los resultados indican que la delección de los iterones no da lugar a plásmidos replicativos en *S.pneumoniae*. Por tanto, pensamos que la región *bind* (que contiene los tres iterones I1-I2-I3) es esencial *in vivo* para la replicación de pLS1.

Mediante análisis por ordenador se observó que los iterones y el sitio de corte reconocido por RepB se encuentran situados en la misma cara del DNA (Fig. 33). Por tanto, especulamos que RepB podría, inicialmente, reconocer *in vivo* los iterones y al unirse a ellos podría posicionarse adecuadamente para reconocer el sitio de corte en la región *nic*. La primera aproximación para analizar esta posibilidad se basó en cambiar de fase los iterones y el sitio de corte, introduciendo 4 pb entre ambos (plásmido $\Omega 4$) y produciendo una rotación de casi media vuelta de hélice entre ellos. Para ello, se utilizaron los plásmidos pLS1-520 y pLS1-570 (como control), cuyos DNAs fueron digeridos con los enzimas *Bam*HI y *Bgl*II, respectivamente. Los extremos 3' recesivos se rellenaron con Pol IK y se ligaron en un volumen de 50 μ l. La mitad de cada transformación se utilizó para transformar *S.pneumoniae* 708, obteniéndose 1.4×10^4 transformantes/ml para pLS1-520 $\Omega 4$ y 1.7×10^5 para pLS1-570 $\Omega 4$. Se analizaron varios clones mediante digestión con *Cla*I, ya que tras cortar con *Bam*HI y *Bgl*II y rellenar con PolIK, se genera un sitio nuevo *Cla*I. La mayoría de los clones de pLS1-570 $\Omega 4$ (inserción de 4 pb en el sitio *Bgl*II) analizados poseen un sitio *Cla*I nuevo y conservan el sitio *Bam*HI. Por el contrario, ninguno de los clones pLS1-520 $\Omega 4$ (inserción de 4 pb en el sitio *Bam*HI) presentaban un sitio *Cla*I nuevo. El resto de la ligación de pLS1-520 $\Omega 4$ se cortó con *Bam*HI para linearizar las moléculas que hubieran escapado de PolIK. Se volvió a transformar *S.pneumoniae* 708 y se seleccionaron los transformantes Tc^r; ninguno de los clones analizados poseía el sitio *Cla*I. Por tanto, no conseguimos obtener *in vivo* ningún transformante basado en el replicón pLS1, que tuviese los iterones y el sitio de corte en fases distintas del DNA. En cambio, sí se consiguió introducir 4 pb más en el sitio *Bgl*II, situado "corriente abajo" de los iterones, mutación que no influiría en la localización de los iterones respecto al sitio de corte ni interferiría con la replicación del plásmido.

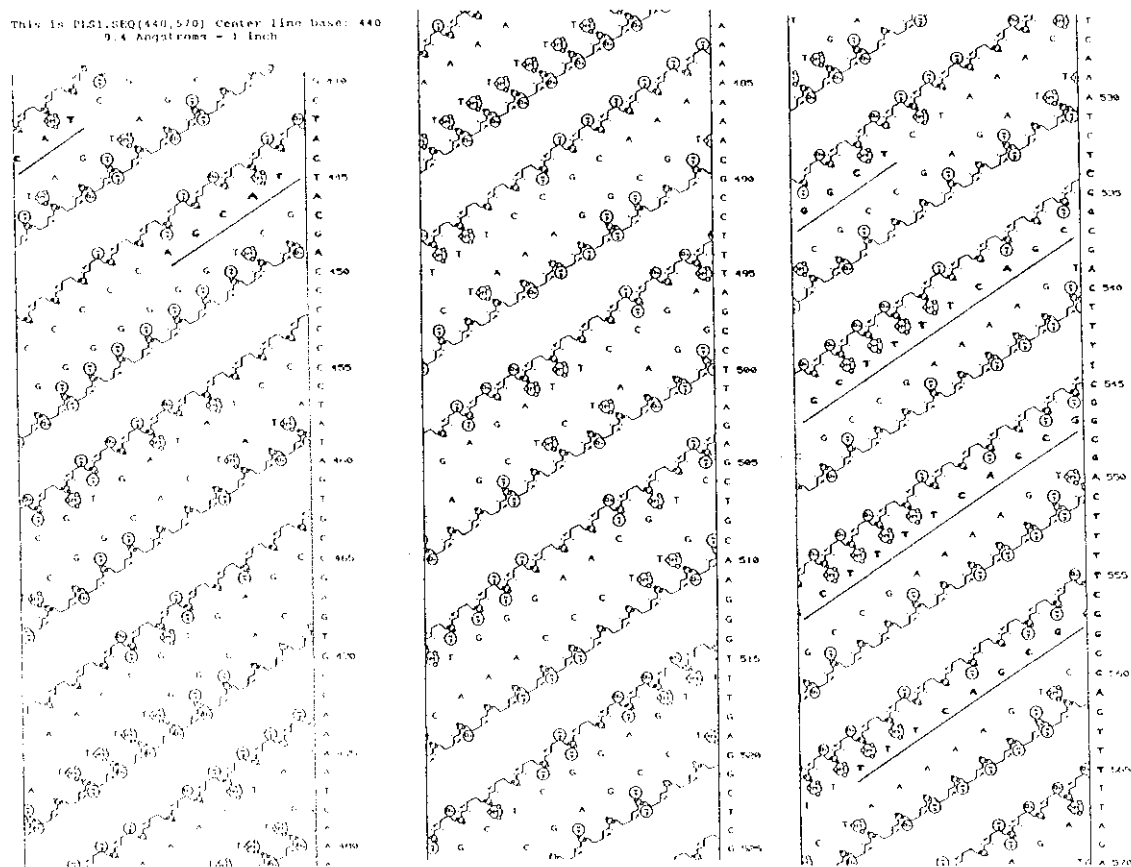


Figura 33. Proyección cilíndrica de la región del DNA de pLS1 (secuencia de nt de pLS1 desde la coordenada 440 a 570) que comprende el sitio de corte y los iterones (en negrita y subrayado).

Como en el replicón pLS1 no se pudo conseguir el cambio de fase entre los iterones y el sitio de corte, se intentó una nueva estrategia. Para ello, se clonó el fragmento *BanI-ApaLI* (393 pb) de pLS1BB en el sitio único *HindIII* de pC194cop, compatible con pLS1. Una vez aislado el fragmento *BanI-ApaLI* de pLS1BB, se ligó a pC194cop linearizado en *HindIII*, cuyos extremos 3' recesivos habían sido previamente rellenados con PolIK. La reacción de ligación se realizó en un volumen de 65 μ l, manteniendo una relación vector:fragmento en moléculas de 4:1. Esta relación no es muy favorable para el clonaje (idealmente sería la inversa), pero la cantidad de DNA del fragmento con la que contábamos era escasa. Se usó la mitad de la ligación para transformar *S.pneumoniae* 708 y se seleccionaron los

transformantes en presencia de Cm. Se obtuvieron 2780 transformantes/ml a las 48 h de incubación a 37°C. Se analizaron varios clones mediante mapeo por restricción y se escogió un clon recombinante con el fragmento *BanI-ApaLI* mutado clonado en la orientación a (según la dirección del gen *cat*), al que se le dio el nombre de pC3BA (Fig. 34A). Nuevamente, se procedió a cambiar de fase los iterones respecto al sitio de corte del *dso*. Para ello, se linearizó el plásmido pC3BA en los sitios únicos *Bam*HI o *Bgl*II por separado, se rellenaron los extremos 3' recesivos con Pol IK y se realizó una ligación en un volumen de 50 μ l. La mitad de cada ligación se utilizó para transformar *S.pneumoniae* 708, induciendo el gen *cat* con 0.1 μ g/ml de Cm, durante

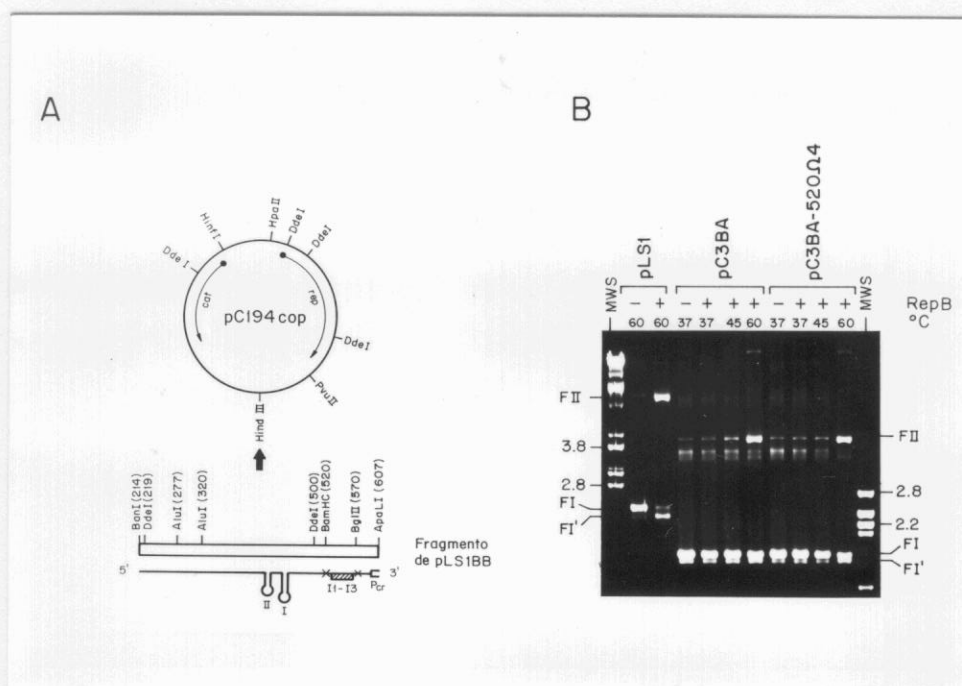


Figura 34. A. Representación esquemática del plásmido recombinante pC3BA. Se representa el fragmento *BanI-ApaLI* de pLS1BB (con el *dso* mutado de pLS1), que fue clonado en el sitio *Hind*III único de pC194cop. En la parte inferior se muestran las Horquillas I y II, los tres iterones (I1-I3; caja sombreada), parte del promotor de los genes *copG* y *repB* (P_{cr}) y las mutaciones introducidas (x) que generaron dos sitios de restricción (*Bam*HI y *Bgl*II) nuevos. **B.** Gel de agarosa con los productos de actividad de la proteína RepB sobre los plásmidos pC3BA y pC3BA-520Δ4. Los ensayos se realizaron con 700 ng de DNA plasmídico y 45 ng de la proteína RepB mediante una incubación de 30 min a las temperaturas indicadas. Como control se incluye una muestra de DNA pLS1 (700 ng) con RepB (45 ng) a 60°C. FI: forma superenrollada; FII: forma circular abierta; FI': forma circular relajada; MWS: marcador de peso molecular.

los últimos 20 min de expresión a 37°C. Los transformantes se seleccionaron para Cm^r y los posibles recombinantes fueron analizados mediante mapeo por restricción, buscando la presencia, como en el caso anterior, de un sitio *ClaI* nuevo. El vector pC194*cop* y el control pC3BA poseen dos sitios *ClaI*, cuya digestión da lugar a dos fragmentos: uno de 1668 pb y otro de 1237 pb (en el caso de pC194) o de 1630 pb (si se trata de pC3BA). Los recombinantes presentarán tres sitios *ClaI*, que dan lugar en el caso de pC3BA-(*Bam*HI Ω 4) a tres fragmentos de 1668 pb, 1172 pb y 462 pb. Para el caso de pC3BA-(*Bgl*II Ω 4), corresponden a 1668 pb, 1122 pb y 512 pb. Se obtuvieron así los plásmidos pC3BA-520 Ω 4 (cambio de fase entre los iterones y la región *nic*, insertando 4 pb) y pC3BA-570 Ω 4 (inserción de 4 pb en el sitio *Bgl*II, situado a la derecha de los iterones). Una vez conseguido este cambio de fase entre los iterones y el sitio de corte, se realizó un ensayo de actividad *in vitro* de la proteína RepB sobre los plásmidos pC3BA (*dso* de pLS1 con los sitios nuevos *Bam*HI y *Bgl*II a ambos lados de los iterones) y pC3BA-520 Ω 4 (inserción de 4 pb en el sitio *Bam*HI situado entre los iterones y el sitio de corte). El ensayo se realizó como en otras ocasiones mezclando 700 ng de DNA plasmídico en tampón B, 20 mM MnCl₂ y con 223 ng de la proteína RepB (preparación de la segunda purificación que resultó con una menor actividad). Las muestras se incubaron durante 30 min a 37, 45 y 60°C, y se paró la reacción con 250 μ g/ml de proteinasa K. Como control se usó DNA de pLS1 y la misma cantidad de RepB, con una incubación de 30 min a 60°C. El análisis de los productos de reacción indicó un pequeño porcentaje de actividad a 60°C, porcentaje que fue ligeramente mayor en el caso de pC3BA-520 Ω 4 (Fig. 34B). Se esperaba obtener un resultado diferente en el cual, la proteína RepB reconociese preferentemente la región *dso* clonada en pC3BA, que mantendría en la misma cara del DNA los iterones respecto al sitio de corte. No obstante, RepB tiene actividad sobre plásmidos que carecen de los iterones y conservan intacta la región *nic* (pCGA7/8). Además, no se puede descartar que los cambios introducidos en el DNA al crear el sitio *Bam*HI, influyan en la actividad y el reconocimiento realizado por la proteína RepB.

Los resultados anteriores no permiten asignar un papel claro a los iterones en el reconocimiento RepB-*dso*. Sin embargo, se deben considerar dos hechos: i) no fue factible construir un replicón pLS1 carente de iterones, y ii) no se consiguió introducir

4 pb (cambio de fase) entre los iterones y el sitio de corte usando el replicón pLS1, situación que se aproximaría más a las condiciones *in vivo*. Ambas observaciones apuntan a un papel esencial de los iterones, si bien aún queda por descifrar su papel *in vivo* en la replicación de pLS1.

10. CURVATURAS INTRÍNSECAS PRESENTES EN EL dso DE pLS1. INFLUENCIA DE RepB

Datos previos de nuestro laboratorio indicaron la presencia de una curvatura muy compleja en esta zona, habiéndose mapeado el centro de la curvatura principal alrededor de coordenada 630 (Pérez-Martín *et al*, 1988). Predicciones realizadas con ordenador sobre el *dso* de pLS1 pusieron de manifiesto que se trataba de una región potencialmente curvada (ver Fig. 76 en Discusión). Para analizar las posibles curvaturas intrínsecas de esta región sin interferencias de la curvatura principal, se clonó el fragmento *BanI*-*ApaLI* (coordenadas 214 a 607, respectivamente; 393 pb) de pMV158 en el vector pBend2 (Kim *et al*, 1989). Este plásmido ha sido diseñado para el análisis de curvaturas en el DNA, intrínsecas o inducidas por proteínas, sin necesidad de recurrir a ensayos de permutación circular de fragmentos de DNA. Se ha comprobado que fragmentos de DNA curvados muestran una movilidad electroforética (en geles nativos de PAA) menor que la de fragmentos de igual tamaño sin curvaturas, migración que depende de la localización del centro de curvatura en el fragmento. De la misma forma, se ha visto que si el sitio de unión de una proteína que induce curvaturas se encuentra situado en el punto medio del fragmento, la movilidad será menor que si el sitio se encuentra próximo a un extremo (Wu y Crothers, 1984). El sitio de multiclonado de pBend2 permite generar diversos fragmentos de DNA de idéntica longitud, en los que el sitio de unión de la proteína (o el centro de curvatura del DNA) se localiza a diversas distancias de los extremos de los fragmentos.

Para realizar el clonaje, se linearizó DNA de pBend2 en su sitio único *SalI*. Por otra parte, se digirió DNA de pMV158 (10 µg) con *BanI* y *ApaLI* (sitios únicos en las

coordinadas 214 y 607, respectivamente), purificándose el fragmento de 393 pb. Los DNAs se trataron con Pol IK y se ligaron en un volumen de 55 μ l, usando una relación vector:fragmento (en moléculas) de 3:1. Una cuarta parte de la ligación se utilizó para transformar *E.coli* JM109. Los transformantes se seleccionaron para Ap^r, obteniéndose sólo un clon con el plásmido recombinante. La orientación del fragmento clonado se analizó por digestión del DNA de pBend2 y del recombinante, pBend-*dso*, con el enzima *Dde*I. La digestión del vector con *Dde*I origina los fragmentos de 687, 540, 465, 426, 409 y 166 pb. Si el fragmento *Ban*I-*Apa*LI se hubiese clonado en la orientación contraria respecto al gen *bla*, se generarían tres fragmentos nuevos de 607, 280 y 193 pb, como así ocurrió. Una vez obtenido el plásmido recombinante pBend2-*dso*, se procedió a analizar la posible curvatura intrínseca en el fragmento clonado. Para ello, el DNA (0.4 μ g) se digirió con los

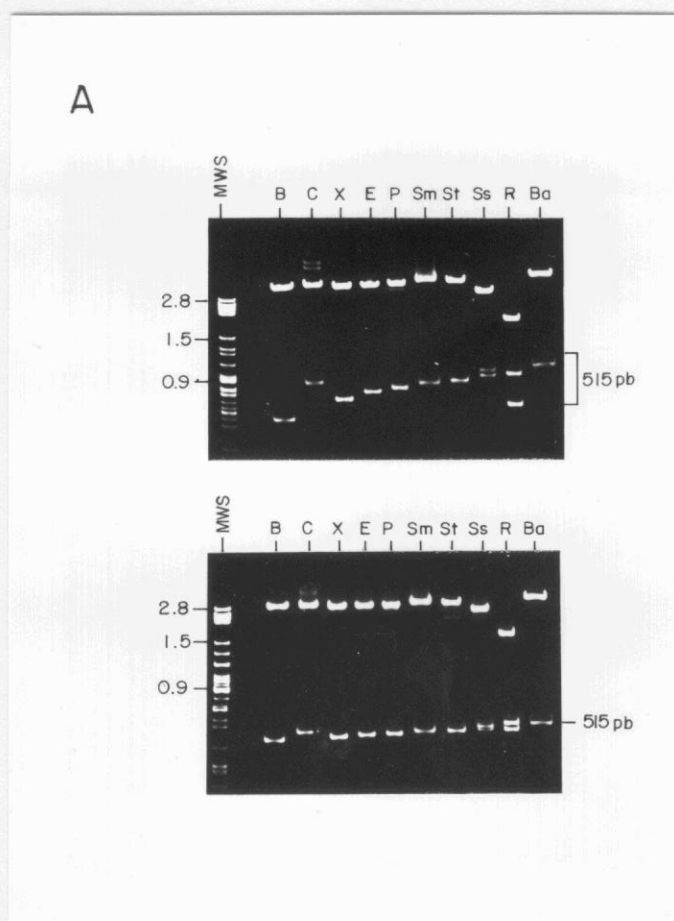


Figura 35. A. Análisis de las curvaturas intrínsecas del fragmento *Ban*I-*Apa*LI clonado en pBend2. El DNA recombinante (0.4 μ g) se digirió con los enzimas *Bgl*II (B), *Cla*I (C), *Xho*I (X), *Eco*RV (E), *Pvu*II (P), *Sma*I (Sm), *Stu*I (St), *Ssp*I (Ss), *Rsa*I (R) y *Bam*HI (Ba). Tras la digestión, la muestra se repartió en dos (0.2 μ g), se añadió directamente el tampón de carga y se analizaron los fragmentos en dos geles 6% PAA nativos; una de las electroforesis se llevó a cabo a 5°C (panel superior) en una cámara fría y la otra se realizó en un incubador a 50°C (panel inferior). MWS: marcador de peso molecular.

enzimas siguientes: *Bgl*II, *Cla*I, *Xho*I, *Eco*RV, *Pvu*II, *Ssp*I, *Rsa*I y *Bam*HI. Tras la digestión, la muestra de DNA se repartió en dos (0.2 μ g), se añadió tampón de carga y se analizaron los fragmentos en dos geles 6% PAA nativos. Una de las electroforesis se realizó a 5°C en una cámara fría y la otra en un incubador a 50°C. Dada la migración de DNA en acrilamida, la migración anómala se acentúa a 5°C y se disminuye a 50°C. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con 0.5 μ g/ml de EtBr y se fotografiaron (Fig. 35A). Se midieron las movilidades relativas (R_L) de cada fragmento a 5 y 50°C. La representación gráfica mostró que no todos los fragmentos tenían la misma movilidad, siendo los fragmentos digeridos con *Bam*HI y con *Cla*I, los que presentaban una mayor diferencia de migración entre las dos temperaturas, lo cual indica que en estos fragmentos con las curvaturas están más centradas. Esto sugiere que: i) existen dos curvaturas intrínsecas dentro del fragmento *Ban*I-*Apa*LI y ii) los centros de éstas curvaturas se localizan alrededor de la coordenada 380-390 y de la coordenada 460-470 de pMV158 (Fig. 35B).

B

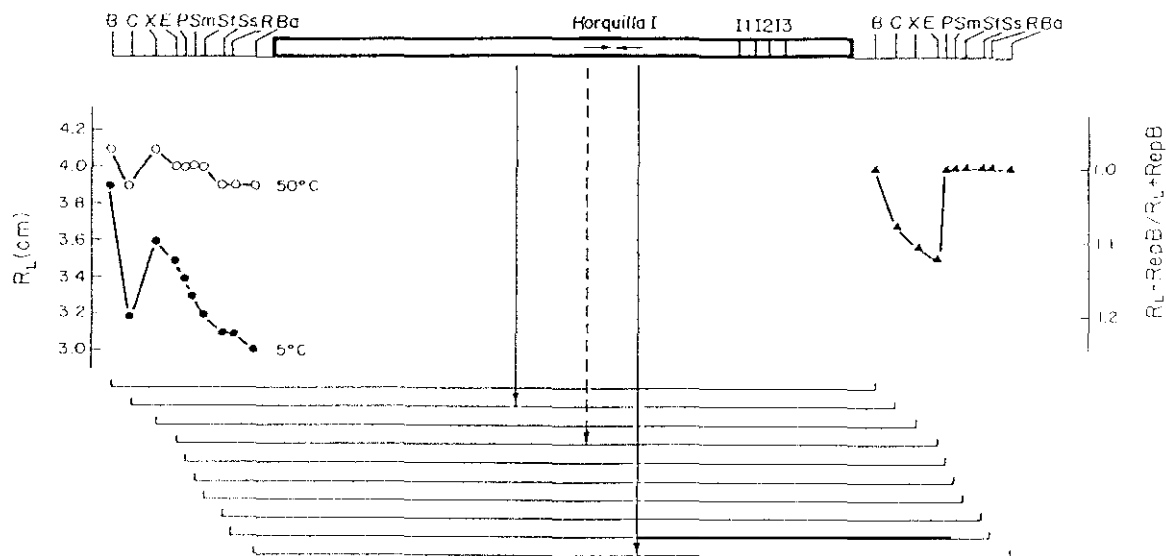


Figura 35. B. Se muestra el sitio de multiclonado de pBend2-*dso*, donde se indica la posición relativa de la Horquilla I y los iterones (I1-I2-I3). A la izquierda se midieron la movilidades relativas (R_L en cm) de cada fragmento a 5 (●) y 50°C (○). A la derecha se representó el cociente $R_L(-RepB)/R_L(+RepB)$ (▲). Se indica la posición relativa de las dos curvaturas intrínsecas (flechas continuas) y el centro de la curvatura inducida por RepB (flecha discontinua).

A continuación se intentó determinar si RepB induce curvaturas en el *dso* de pMV158. Para ello, el DNA de pBend2-*dso* (0.4 μ g) se digirió con *Bgl*II, *Eco*RV y *Bam*HI; la muestra se dividió en dos (0.2 μ g) y fue incubada (+) o no (-) con RepB (110 ng) en tampón B, durante 30 min a t.a. Se añadió el colorante de carga y la muestras se analizaron por electroforesis en un gel de PAA al 6%. En los tres casos se observó retención del fragmento clonado por disminución de la banda correspondiente (515 pb) en las muestras tratadas con RepB. Tras este resultado se realizó un nuevo ensayo con 0.6 μ g de DNA de pBend2-*dso*, que fue digerido con los mismos enzimas de restricción *Bgl*II, *Eco*RV y *Bam*HI. Cada digestión se repartió en tres muestras, las cuales se incubaron (+) o no (-) con RepB (110ng). Una de las muestras (+) incluía heparina (0.2 μ g/ μ l) como competidor, la cual se añadió en los últimos 10 min de incubación. Las reacciones se incubaron en tampón B durante 30 min a t.a., se les añadió el colorante de carga y se analizaron en un gel mixto 0.5% agarosa-1.8% acrilamida. El resultado (Fig. 35C) mostró una retención específica por RepB de la banda de 515 pb en los fragmentos *Eco*RV y *Bam*HI, los cuales sitúan el

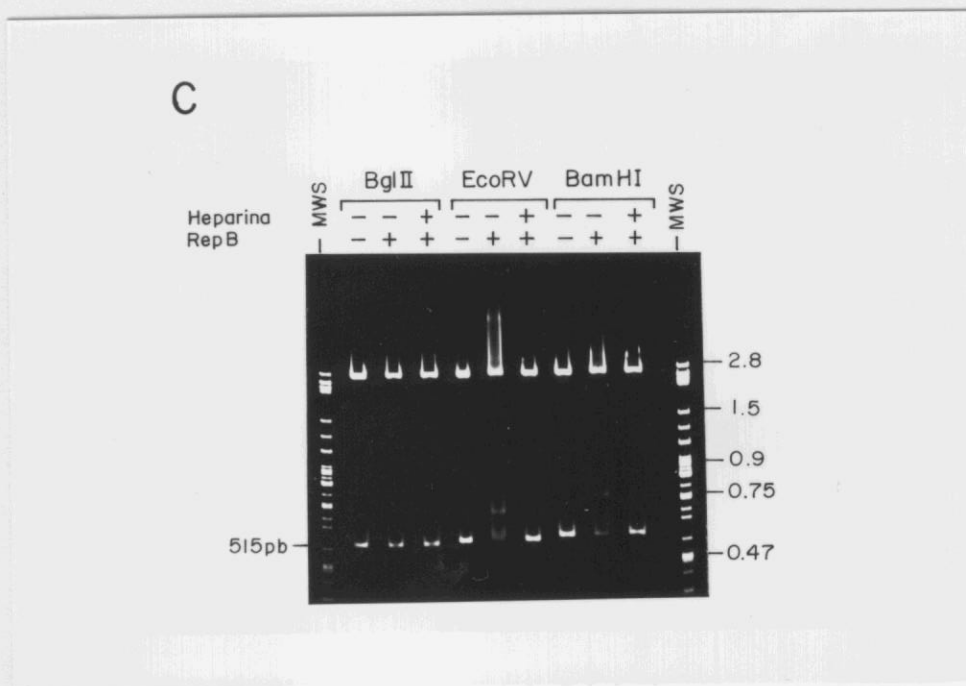


Figura 35. C. Influencia de la proteína RepB sobre el fragmento clonado en pBend2. DNA de pBend2-*dso* (0.6 μ g) fue digerido con los enzimas *Bgl*II, *Eco*RV y *Bam*HI. Cada digestión se repartió en tres muestras que fueron tratadas (+) o no (-) con RepB (110ng), una de las muestras (+) incluía heparina (0.2 μ g/ μ l) como competidor, y se añadió en los últimos 10 min de incubación. Las reacciones se incubaron durante 30 min a t.a. y se analizaron en un gel mixto 0.5% agarosa-1.8% acrilamida. MWS: marcador de peso molecular.

fragmento clonado en el centro y hacia la derecha. RepB no retuvo el fragmento de 515 pb en presencia de heparina. Para definir mejor la posible curvatura inducida por RepB, se digirió DNA de pBend2-*dso* (0.4 μ g) con *Bgl*II, *Cla*I, *Xho*I, *Eco*RV, *Pvu*II, *Sma*I, *Stu*I, *Ssp*I, *Rsa*I y *Bam*HI. La mitad de cada digestión (0.2 μ g) se incubó con RepB en las condiciones anteriores y las muestras se analizaron en un gel mixto 0.5% agarosa-1.8% acrilamida. La representación gráfica del cociente de las movilidades aparentes de los fragmentos en presencia o ausencia de RepB (Fig. 35B), mostraron que RepB induce curvatura en el *dso* de pMV158 y que el centro de esta curvatura se localiza alrededor de la coordenada 410 de pMV158.

11. IDENTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS FII + FI' GENERADOS POR RepB

Como ya se ha mostrado, la actividad de RepB sobre DNA plasmídico superenrollado (formas FI) se refleja en la aparición de nuevas bandas con distinta migración electroforética: una banda de migración lenta correspondiente a formas FII (circular abierta), que se generan como consecuencia del corte específico en una de las hebras, y formas FI' (circular relajada), que son consecuencia de la actividad de corte/cierre de la proteína. Las formas FI' se agrupan en una única banda de migración ligeramente más rápida que las formas FI cuando la electroforesis se realiza en presencia del agente intercalante EtBr (Fig. 36A), o se detectan como distintas bandas de migración más lenta que las formas FI cuando la electroforesis se realiza en ausencia de EtBr (Fig. 36B).

Para conocer la distribución de topoisómeros generados tras la actuación de RepB, se realizó un ensayo de actividad usando DNA de pLS1 (700 ng) y 45 ng de RepB en un volumen final de 30 μ l. Las muestras se incubaron durante 30 min a 37, 45 y 60°C, y se trataron del modo habitual. Los productos de reacción se analizaron en geles de agarosa conteniendo cloroquina (2 μ g/ml), que se trataron como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados mostraron una diferente distribución de topoisómeros entre el control no tratado y las muestras incubadas con RepB (Fig. 37A). Estas muestras acumulaban bandas en la parte inferior del gel, que

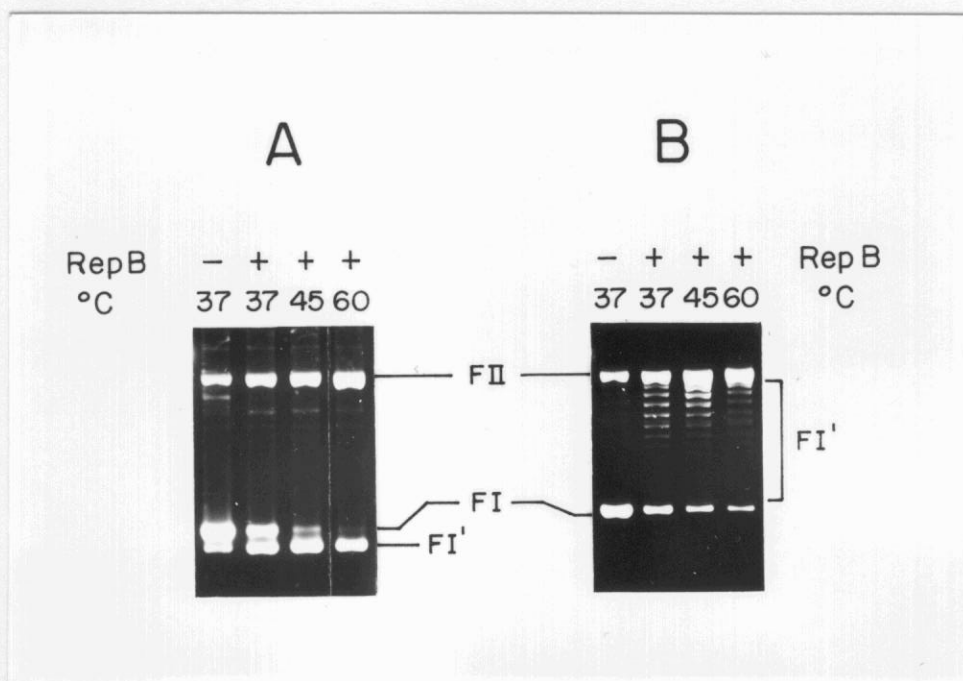


Figura 36. Análisis de los productos generados por RepB sobre DNA superenrollado de pMV158. Se realizó una incubación con 700 ng de DNA plasmídico y 45 ng de proteína, durante 30 min a 37, 45 y 60°C. Los productos de reacción se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% conteniendo (A) o no (B) 0.5 μ g/ml de EtBr. Se indica la posición de la formas FI (DNA superenrollado), FII (forma circular abierta) y FI' (forma circular relajada).

podrían corresponder a formas superenrolladas positivamente que se generaron al intercalarse la cloroquina en las formas relajadas producidas por RepB. Para comprobar esto, el DNA de pLS1 se relajó totalmente con topoisomerasa I: 1400 ng de DNA de pLS1 se trataron con 16 u de topoisomerasa I en el tampón T (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) y 20% de glicerol, en un volumen final de 60 μ l. La incubación se realizó a 37°C durante 1 h; la reacción se trató con 129 μ g/ml de proteinasa K. La muestra se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% conteniendo 0.5 ó 2 μ g/ml de cloroquina. Con la menor cantidad de cloroquina, las formas relajadas por la topoisomerasa I aparecen como distintas bandas de migración lenta (Fig. 37C). Al subir cuatro veces la cantidad de cloroquina (2 μ g/ml), la situación se invierte: las formas relajadas migran más rápido en el gel y prácticamente como una banda única (Fig. 37B). De esta forma comprobamos, que las bandas inferiores del gel en las muestras tratadas con RepB corresponden a formas relajadas, en las cuales se han ido introduciendo vueltas de

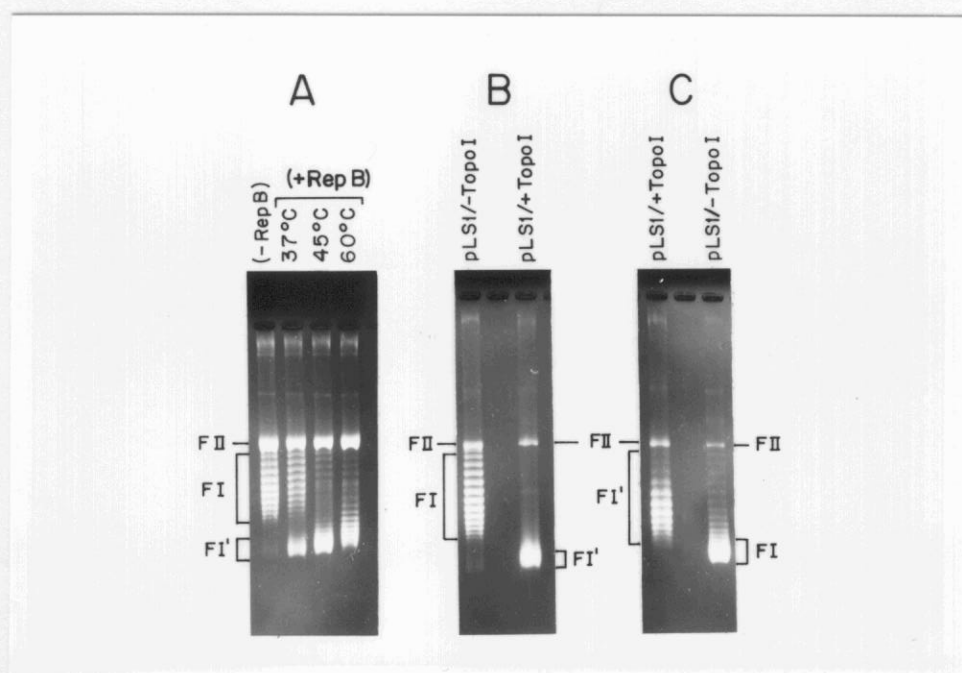


Figura 37. Separación de los distintos topoisómeros generados por RepB. Muestras de DNA de pLS1 (700 ng) tratadas con la proteína RepB (45 ng) a 37, 45 y 60°C, se analizaron en geles de agarosa al 1% con 2 µg/ml de cloroquina (A). Se incluye un control de DNA de pLS1 relajado con topoisomerasa I, que fue analizado en geles de agarosa al 1% con dos cantidades distintas de cloroquina: 0.5 (C) y 2 µg/ml (B). FI: forma circular superenrollada; FII: forma circular abierta; FI': forma circular relajada.

superenrollamiento positivo al intercalarse la cloroquina. La separación clara entre los topoisómeros positivos y negativos se puede obtener analizando las muestras en geles bidimensionales. Para analizar la distribución de topoisómeros en muestras de DNA tratadas con RepB, se incubó DNA de pLS1 (1400 ng) y 445 ng de proteína RepB (segunda purificación, con menor actividad proteica), en un volumen final de 60 µl. Se realizó una incubación de 30 min a 37, 45 y 60°C y la reacción se paró con 625 µg/ml de proteinasa K. También se incluyó un control de DNA sin tratar con RepB para cada una de las temperaturas. Las muestras se analizaron mediante electroforesis bidimensionales. La primera dimensión se realizó en geles de agarosa al 0.8%, en tampón TBE y 1.5 mg/ml de cloroquina. En la primera mitad del gel se cargaron las muestras control (DNA no tratado) y las muestras de DNA tratadas con RepB a 37, 45 y 60°C. En la segunda mitad del gel se realizó una primera carga con las muestras tratadas con RepB a las tres temperaturas y al cabo de 2 h 30 min de electroforesis se realizó una segunda carga (en los mismos pocillos) con los controles

de DNA de pLS1 no tratado. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 2.7 V/cm. Se separaron las dos mitades del gel, eliminándose la cloroquina de la primera mitad, tiñéndose (1 μ g/ml de EtBr) y fotografiándose después (Fig 38A). Cada carril con las muestras de la segunda mitad del gel, se cortó en tiras longitudinales, se giraron 90° y se colocaron en cubetas de electroforesis que se rellenaron con agarosa al 1% en tampón TBE y 15 μ g/ml de cloroquina. La electroforesis y tratamiento de los geles de la segunda dimensión se realizó en las mismas condiciones que la vez anterior. Para visualizar mejor los topoisómeros, las muestras de DNA se sometieron a desnaturalización alcalina y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa. Tras realizar una hibridación de 16 h a 37°C, usando DNA de pLS1 marcado con [α -³²P]dCTP como sonda, los filtros se lavaron y secaron, antes de exponerlos a películas autorradiográficas con pantallas amplificadoras (Fig. 38B, C y D). La curva que se origina en este tipo de geles presenta dos puntos de inflexión (I y II) que corresponden a las movilidades electroforéticas mínimas en la primera y segunda dimensión, respectivamente. Por tanto, el punto I representa la posición de un DNA relajado bajo las condiciones de la primera dimensión. Las bandas situadas a la derecha de I son superenrolladas positivamente durante la electroforesis mientras que las situadas a la izquierda están negativamente superenrolladas (Chen *et al*, 1994). Estos datos se corresponden con los resultados obtenidos y nos permiten separar e identificar los productos generados por RepB; los topoisómeros positivos se corresponden con las formas relajadas (FI') y los negativos con las formas superenrolladas (FI).

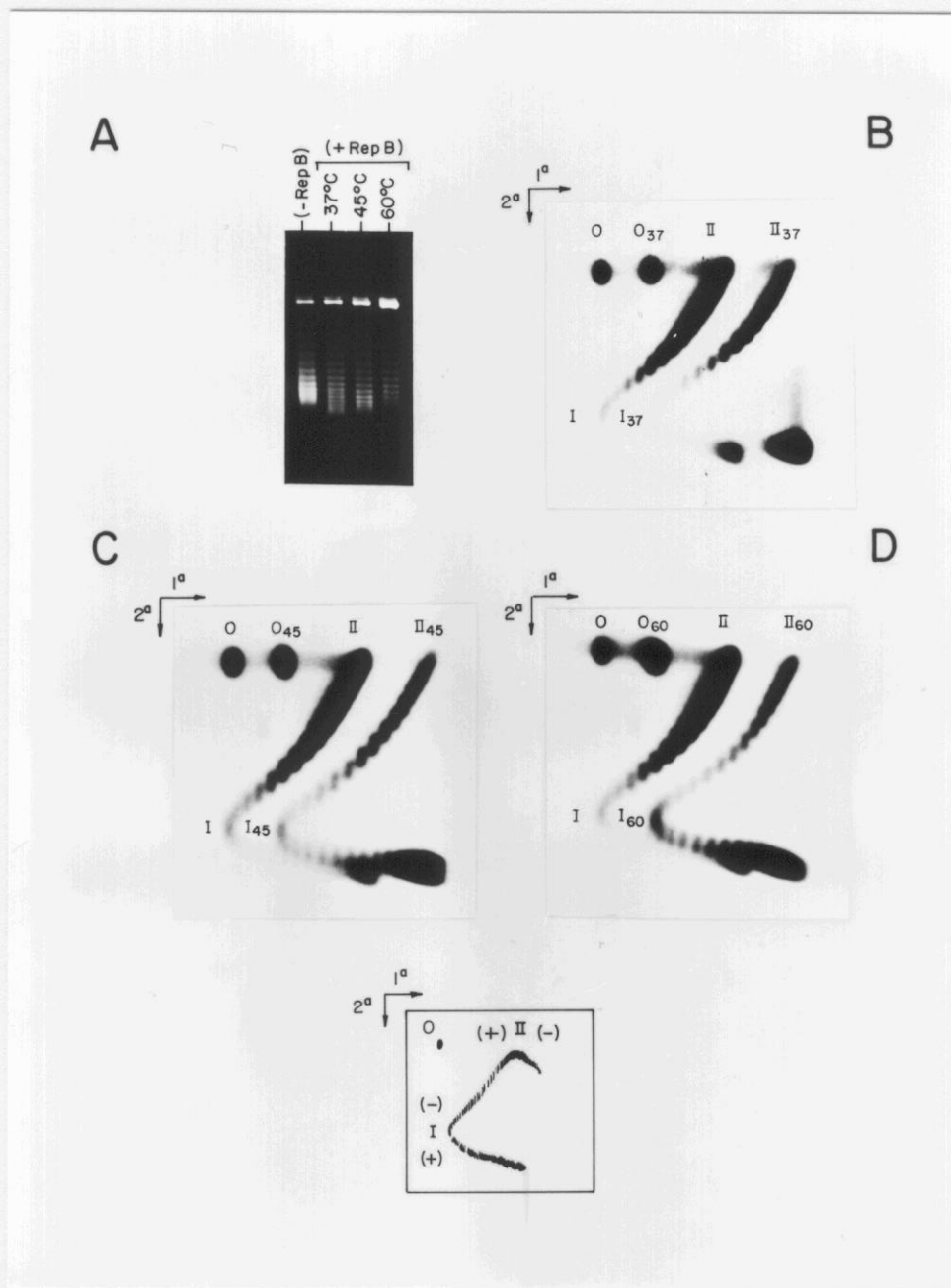


Figura 38. Análisis de los productos de reacción de RepB mediante geles bidimensionales. Ensayos realizados con 700 ng de DNA pLS1 y 45 ng de RepB, e incubaciones de 30 min a 37, 45 y 60°C. Primera dimensión (A): gel de agarosa al 0.8% con 1.5 µg/ml de cloroquina. Segunda dimensión: los carriles de la primera dimensión que llevaban dos cargas en el mismo pocillo [primera carga: muestra con RepB y segunda carga (2h 30 min más tarde): control sin RepB] se cortaron, se giraron 90° y se incluyeron en geles de agarosa al 1% con 15 µg/ml de cloroquina. El DNA fue transferido a filtros de nitrocelulosa y se realizó una hibridación usando DNA de pLS1 como sonda. Se muestran las autorradiografías de las muestras a 37 (B), 45 (C) y 60°C (D), con la distribución de los topoisómeros positivos y negativos, generados tras la electroforesis y a la concentración de cloroquina utilizada. Se indican la posición de las formas circular abiertas (OC): 0 para el control sin proteína y O₃₇, O₄₅ y O₆₀, para las muestras con RepB a cada una de las temperaturas ensayadas. Asimismo se indican por I y II, la posición de los dos puntos de inflexión de cada curva, que corresponden a los puntos de menor movilidad electroforética. En un esquema adjunto se indica con (+) a los topoisómeros superenrollados positivamente y con (-) a los negativamente superenrollados durante la electroforesis.

12. RepB PARECE RECONOCER CON DISTINTA EFICIENCIA A PLÁSMIDOS DERIVADOS DE pMV158

La secuencia de reconocimiento y corte de la proteína RepB sobre DNA superenrollado de pLS1 se determinó en el lazo terminal de una potencial estructura secundaria (H-I, coordenadas 431-459; de la Campa *et al*, 1990), localizada en pLS1 ($\Delta ssoU$ y Δmob de pMV158) mediante análisis por ordenador y mapeada por sensibilidad a la endonucleasa S1 sobre DNA superenrollado (del Solar *et al*, 1987b). De la misma forma se localizaron otras dos posibles estructuras secundarias alrededor de las coordenadas de pLS1, 100-170 (que resultó ser mayoritaria a 37°C y correspondería a la denominada Horquilla III) y 4170-4200 (correspondiente al *ssoA*). Además de estas tres estructuras secundarias mayoritarias, mapeadas en pLS1, el plásmido parental pMV158 tiene la región *ssoU* (Priebe y Lacks, 1989), situada a la derecha del gen *mob*, y que posee un alto potencial para formar una estructura secundaria compleja, aún no mapeada. Dado que RepB no actúa sobre DNA bicatenario lineal (como se verá más adelante), una hipótesis plausible sería que la actividad de RepB sobre DNA superenrollado supusiera la extrusión de H-I y la consiguiente exposición de la región de corte como ssDNA, de modo semejante a la proteína RepC de pT181 (Noirot *et al*, 1990). Si esto fuese correcto, la efectividad de RepB podría verse incrementada si todas la moléculas DNA sustrato tuvieran H-I expuesta, con la región *nic* como ssDNA fácilmente reconocida por la proteína. Por tanto, se pensó que la actividad de RepB podría ser mayor sobre derivados de pMV158 carentes de las regiones con potencial para generar estructuras secundarias que pudiesen actuar como competidores (en la extrusión de la estructura tipo tallo-lazo) de H-I. Para analizar esta suposición, se ensayó la actividad de RepB sobre pMV158 (parental de esta serie; Burdett, 1980), y los derivados siguientes: pLS1 ($\Delta ssoU$, Δmob de pMV158; Lacks *et al*, 1986), pLS5 (deleción *in vivo* de las coordenadas 34-365 de pLS1, $\Delta rnaI$ y carece de la Horquilla III; Lacks *et al*, 1986), pLS4 (deleción del fragmento menor *HindIII-NcoI* de pLS5 que corresponde a la Horquilla IV, $\Delta ssoA$, $\Delta rnaI$; del Solar *et al*, 1987b) y pLS1 $\Delta 24cop7$ (deleción por BAL31 de las coordenadas 4240-401 de pLS1 $cop7$, $\Delta rnaI$; Puyet *et al*, 1988). Para cada

plásmido se realizaron experimentos a tres temperaturas (37, 45 y 60°C), variando la concentración de proteína utilizada o los tiempos de incubación de la reacción.

Los ensayos dependientes de la concentración de proteína se realizaron con cantidades de RepB que variaban entre 5.6 y 112,5 ng, correspondientes a una relación proteína/DNA en masa de 0.008 y 0.16. La cantidad de DNA sustrato fue constante e igual a 700 ng y las reacciones se llevaron a cabo en tampón B suplementado con 20 mM MnCl_2 , en un volumen final de 30 μl . La incubación fue de 30 min a las temperaturas ya indicadas, y se paró la reacción con 125 $\mu\text{g/ml}$ de proteinasa K. Tras añadir el tampón de carga BXGE, las muestras se analizaron en geles de agarosa (1% en TBE) con 1 $\mu\text{g/ml}$ de EtBr. El porcentaje de actividad se calculó a partir de la densitometría de los negativos de los geles fotografiados. En cada caso se realizó una representación gráfica del porcentaje de formas FII (circular abierta) y FI' (circular relajada) generadas por RepB, respecto a la relación en masa proteína/DNA utilizada en la reacción (Fig. 39A). Como se ha indicado anteriormente, y aquí se puede corroborar, el porcentaje de los productos de reacción (formas FII + FI') generados por RepB depende fundamentalmente de la temperatura de incubación, obteniéndose los mayores porcentajes de actividad, en todos los casos, a 60°C. A concentraciones de proteína superiores a 40 ng, la reacción se encuentra prácticamente saturada, lo cual se refleja en cambio de la pendiente de las curvas, con ausencia de incrementos significativos en la cantidad de formas FII + FI' generadas. Aunque RepB fue capaz de reconocer y actuar sobre todos los derivados de pMV158 analizados, se pudo observar que el mejor sustrato, a las tres temperaturas analizadas, fue el DNA del plásmido parental (pMV158). El menos sensible fue el DNA de pLS4, donde sólo se alcanzó un 40% de relajación a 37°C a la máxima concentración de proteína utilizada, condiciones en las que se alcanzó un 80% de relajación a 60°C. Los resultados obtenidos utilizando distintos DNAs sustrato mostraron, en general, el mismo patrón: valores más altos para pMV158, valores muy similares para los plásmidos pLS1, pLS5 y pLS1 Δ 24*cop*7, y menores para el plásmido pLS4.

Las cinéticas de las reacciones se estudiaron mediante ensayos de actividad con 700 ng de DNA plasmídico y 45 ng de proteína RepB, en tampón B suplementado con

A

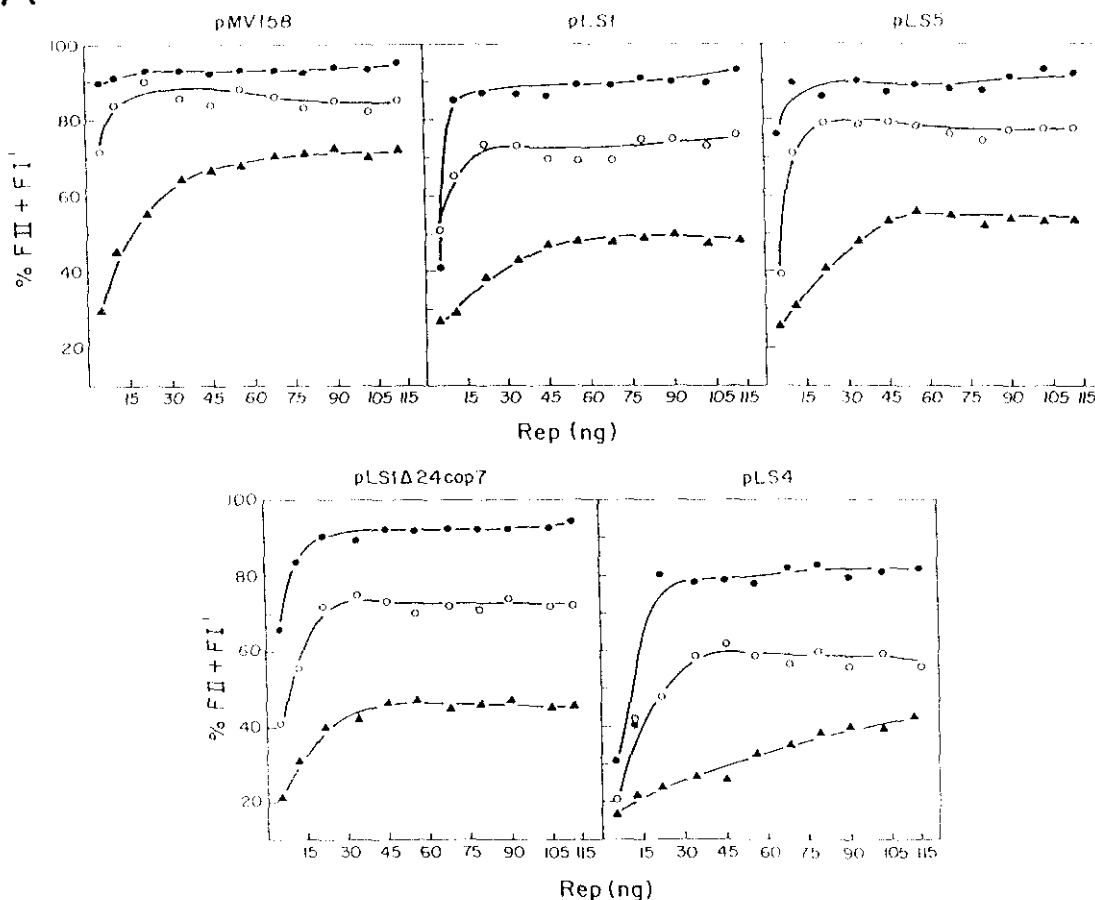


Figura 39. RepB parece reconocer con distinta eficiencia a plásmidos derivados de pMV158. A. Representación gráfica de la actividad de RepB (% FII + FI') sobre los distintos derivados de pMV158 en función de la concentración de la proteína. Ensayos realizados con 700 ng de DNA sustrato y distintas concentraciones de RepB (entre 5.6 y 112.5 ng), con incubaciones de 30 min a 37 (▲), 45 (○) y 60°C (●).

20 mM MnCl_2 , en un volumen final de 30 μl . Las muestras se incubaron a las temperaturas de 37, 45 y 60°C, durante los siguientes tiempos: 5, 15, 30, 45, 60 y 120 segundos, 5, 10 y 30 min. La reacción se paró a 4°C, con 4 μl de la solución STOP, tras lo cual se mantuvo durante 10 min a t.a. Los productos de reacción y el cálculo del porcentaje de actividad de RepB se realizaron como antes. Los resultados obtenidos se representaron gráficamente como el porcentaje de formas FII + FI' generadas por RepB frente a los tiempos de incubación de la reacción (Fig. 39B). Las cinéticas mostraron de nuevo que la actividad de corte/cierre de RepB es muy rápida a 60°C, puesto que tras 1 min de incubación, el porcentaje de formas FII + FI'

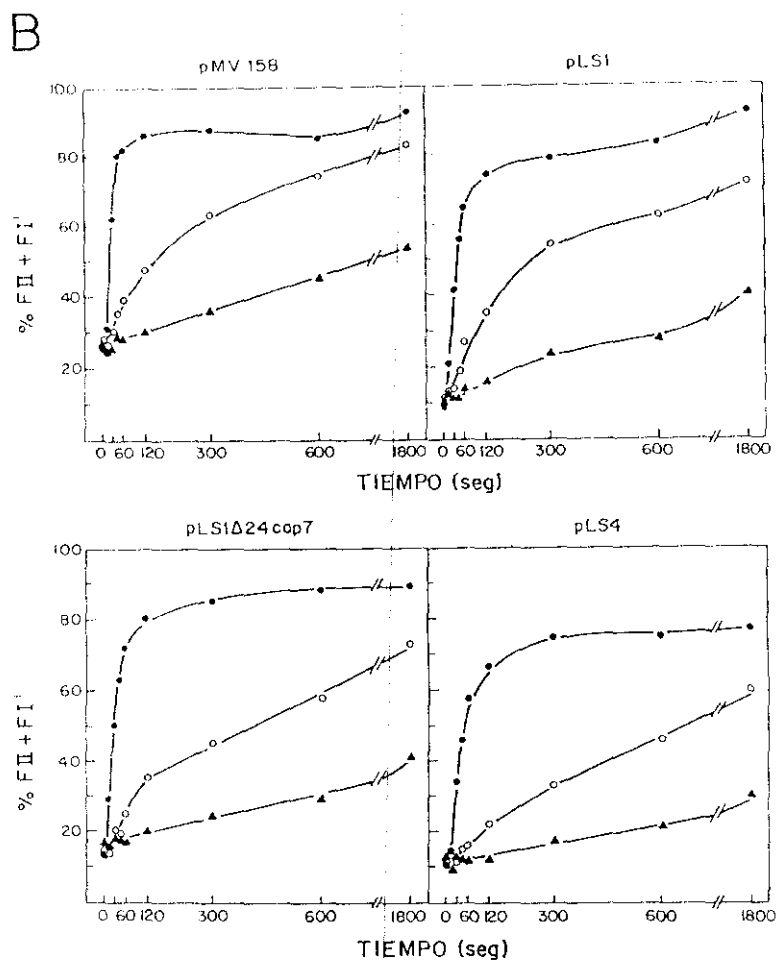


Figura 39. B. Cinéticas de la reacciones DNA-proteína, usando 700 ng del DNA plasmídico y 45 ng de RepB. Se realizaron incubaciones a 37 (▲), 45 (○) y 60°C (●) durante los tiempos indicados. Representación gráfica de la actividad de RepB (% FII + FI') frente a los tiempos de incubación.

alcanzó valores comprendidos entre un 58% (para pLS4) y un 82% (para pMV158). También se pudo observar que la reacción transcurre de forma más lenta a 37 y 45°C, y que tras 30 min de incubación a la mejor temperatura (37°C) no se ha conseguido todavía saturar la reacción, alcanzándose el 50% de actividad sobre el DNA de pMV158. Como las reacciones a 60°C, en las condiciones ensayadas, transcurre en tiempos tan cortos, se realizó un experimento a 60°C, usando DNA de pLS1 (700 ng) y tres concentraciones de RepB: 9, 22.5 y 45 ng, que corresponden a una relación DNA:RepB (en moléculas) igual a (1:1.5), (1:3.8) y (1:7.5) respectivamente, asumiendo que todas las moléculas de nuestra preparación proteica son activas y considerando éstas, como monómeros. Los resultados obtenidos fueron similares,

aunque se observó una ligera disminución de actividad a una menor cantidad de proteína y a tiempos inferiores a 5 min (Fig. 40).

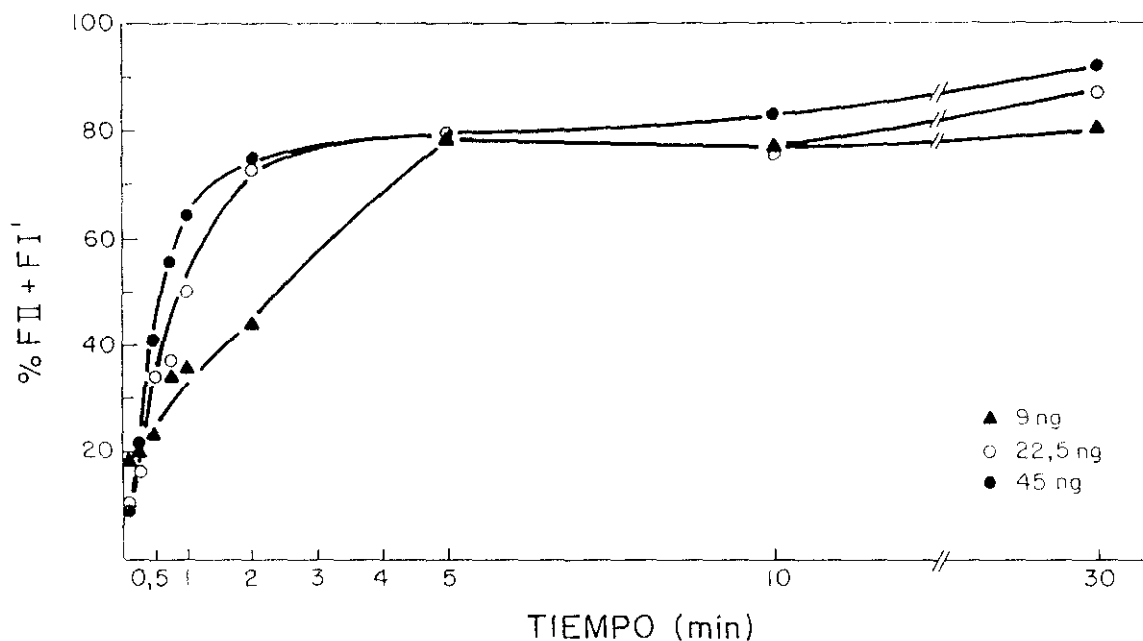


Figura 40. Cinética de la reacción de corte/cierre de RepB sobre DNA de pLS1 a 60°C. El DNA (700 ng) se incubó en presencia de tres concentraciones distintas de proteína [9 (▲), 22,5 (○) y 45 ng (●)] a 60°C durante los tiempos indicados. Representación gráfica del porcentaje de actividad de RepB (% FII + FI') frente a los tiempos de incubación.

Podemos concluir, en principio, que la carencia de regiones capaces de generar estructuras secundarias competidoras de H-I no mejora, sino al contrario, el reconocimiento de DNA superenrollado por RepB. Aunque *a priori*, parece lógico suponer que pLS4 (que carece de la Horquilla III y de las estructuras secundarias de las regiones *ssoA* y *ssoU*) sería más sensible a RepB que los otros derivados de pMV158, los ensayos realizados mostraron que el DNA de pLS4 fue el menos sensible de todos los sustratos ensayados a la proteína RepB, dado que: i) sólo un 20% del DNA de pLS4 fue relajado por RepB tras 10 min de incubación a 37°C, frente al 45% obtenido con el DNA de pMV158, y ii) a 37°C sólo se alcanzó un 40% de actividad sobre el DNA de pLS4, con una incubación de 30 min y a la mayor concentración de proteína ensayada (112.5 ng) frente al 72% de actividad obtenido en las mismas

condiciones con el DNA de pMV158. Estos resultados podrían indicar que RepB posee una menor capacidad para reconocer el *dso* cuando se eliminan algunas secuencias de pMV158 que, aparentemente, no son importantes en la replicación del plásmido (del Solar *et al*, 1987a).

Asimismo, se ensayó la actividad de RepB sobre otros derivados de pLS1 que presentaban mutaciones y/o deleciones en el gen *copG* (que codifica el represor transcripcional que actúa sobre el promotor de los genes *copG* y *repB*) o deleciones en el gen *repB*. Como DNA sustrato se utilizaron los siguientes plásmidos: pLS5*copII* (inserción de 4 pb entre las cajas -35 y -10 del promotor P_{cr} , $\Delta rnaI$; del Solar y Espinosa, 1992), pLS1 $\Delta A4$ ($\Delta copG$; del Solar y Espinosa, 1992), pLS1 $\Delta A15$ ($\Delta copG$, $\Delta repB$; del Solar *et al*, 1993b) y pJS4 ($\Delta repB$; Ballester *et al*, 1986). Hay que indicar que la actividad de RepB sobre pLS1 $\Delta 24cop7$ (que carece del RNA I y en cuya proteína CopG se ha sustituido el residuo Ala30 por un Glu) se ensayó previamente, obteniéndose unos valores muy similares a los de pLS1. Como control se utilizó DNA de pLS1. Los ensayos se realizaron de la misma forma que en ocasiones anteriores, utilizando 700 ng de DNA sustrato y 45 ng de proteína, con incubaciones de 30 min a 37, 45 y 60°C (Fig. 41). Los resultados obtenidos con los derivados que carecen o poseen el gen *copG* mutado, fueron en todos los casos muy similares a los obtenidos con pLS1: valores cercanos al 45% a 37°C (exceptuando el 37% obtenido con pLS1 $\Delta A4$), al 75% a 45°C y, entre el 80 y 95% a 60°C. En el caso de pJS4 ($\Delta repB$) se obtuvieron unos valores ligeramente inferiores a los correspondientes a pLS1, pero hay que tener en cuenta que este plásmido carece del gen *repB*, por lo que se copurifica con su acompañante pLS1, de modo que RepB actuaría sobre ambos plásmidos. Esto mismo ocurriría con pLS1 $\Delta A15$, pero como la diferencia entre este plásmido y el pLS1 que lo acompaña no se aprecia en las condiciones de electroforesis utilizadas, el valor de actividad calculado es un resultado conjunto para ambos plásmidos.

Los resultados obtenidos muestran que RepB es capaz de relajar como máximo, un cierto porcentaje de DNA superenrollado presente en la reacción, de una forma que es dependiente de la temperatura. Se podría pensar que a 37°C, sólo una pequeña fracción de las moléculas de DNA sustrato presentan expuesta como tal, la Horquilla

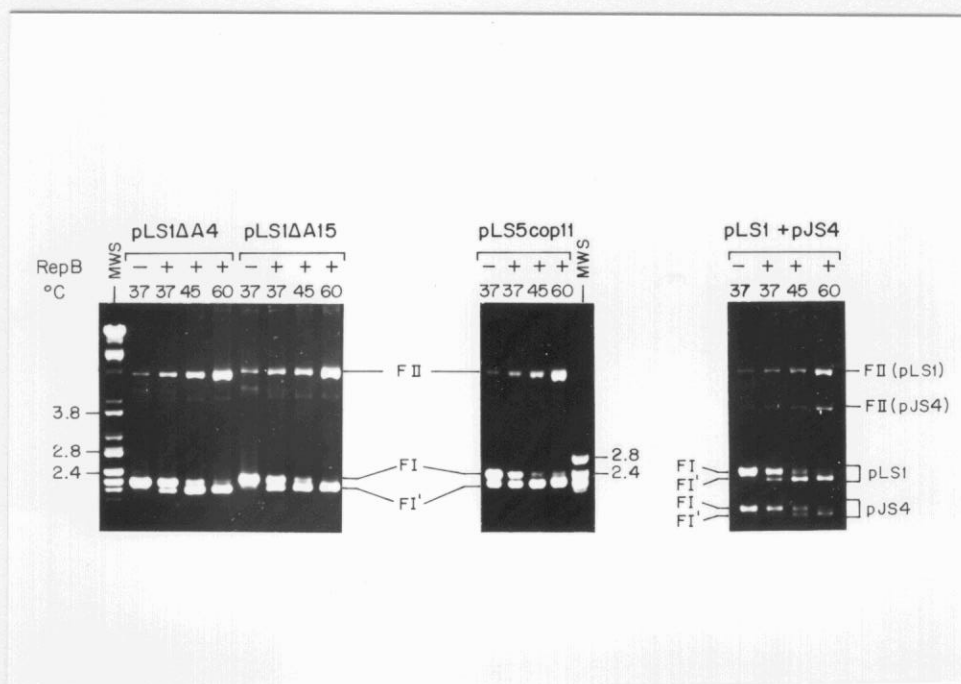


Figura 41. Actividad de la proteína RepB sobre derivados de pLS1 que poseen mutaciones puntuales o deleciones en los genes *copG* (pLS1ΔA4 y pLS5*cop11*) y *repB* (pLS1ΔA15 y pJS4). Los DNAs plasmídicos (700 ng) se incubaron con la proteína RepB (45 ng) durante 30 min a 37, 45 y 60°C. Los productos de reacción se analizaron en geles de agarosa al 1%, en tampón TBE y 0.5 µg/ml de EtBr. FI: forma superenrollada; FII: forma circular abierta; FI': forma circular relajada; MWS: marcador de peso molecular.

I y, en consecuencia, exhiben el sitio de corte en configuración monocatenaria para ser sustrato de RepB, mientras que el resto de las moléculas serían insensibles a la proteína. Esta fracción de moléculas que presentan expuesta H-I (y que por tanto, son potencialmente sensibles a RepB), podría aumentar con la temperatura, ya que se sabe que la generación de estructuras secundarias tipo tallo-lazo depende de ella (Bowater *et al*, 1991). No obstante, la extrusión de H-I podría verse condicionada también, por el grado de superenrollamiento del DNA plasmídico. Por ello, se analizó el número y distribución de topoisómeros entre los distintos DNAs sustrato. El ensayo se realizó con 400 ng de DNA plasmídico superenrollado purificado mediante dos gradientes consecutivos de CsCl-EtBr; los distintos topoisómeros se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa conteniendo 2 µg/ml de cloroquina. Esta se eliminó mediante lavados con agua destilada, tras lo cual se realizó una tinción con 5 µg/ml de EtBr. Los geles fueron sumergidos en agua destilada para eliminar el

exceso de EtBr y se fotografiaron bajo luz UV. El número y distribución de topoisómeros se analizó mediante densitometría de los negativos obtenidos (Fig. 42). En los plásmidos pMV158 y pLS1 se observó una distribución prácticamente simétrica de los topoisómeros. En el caso de pLS4 el número de topoisómeros obtenido fue menor y se localizaban principalmente a la derecha de la gráfica. Estos resultados sugieren que el peor reconocimiento del DNA de pLS4 por RepB se debería a que este plásmido presenta una densidad de superenrollamiento menor que pMV158, con lo que la probabilidad de una mayor frecuencia de extrusión de H-I sería menor en pLS4 que en pMV158.

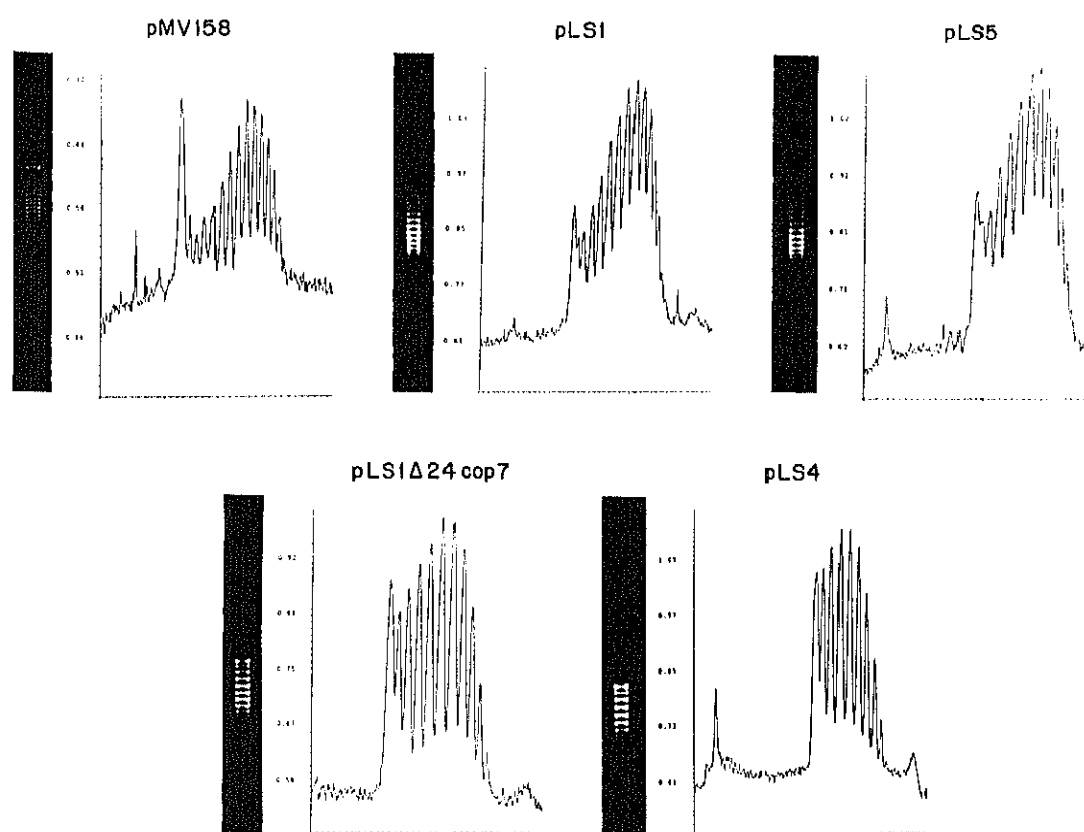


Figura 42. Número y distribución de los topoisómeros de distintos derivados de pMV158, separados en geles de agarosa al 1% conteniendo 2 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina. Junto a los geles se muestran los resultados del análisis densitométrico de los negativos obtenidos.

En resultados anteriores se ha señalado que RepB manifiesta unos valores altos de actividad cuando se usa como sustrato DNA de pMV158 y pLS1. Sin embargo, tanto en las cinéticas como en la actividad en función de la concentración de proteína, los valores más altos correspondieron al DNA del plásmido parental, pMV158. Para comprobar si esta diferencia se debía a que la proteína RepB presentaba una mayor afinidad en el reconocimiento del DNA de pMV158 como sustrato, respecto al DNA de pLS1, se realizaron experimentos de competición *in vitro* entre los dos plásmidos.

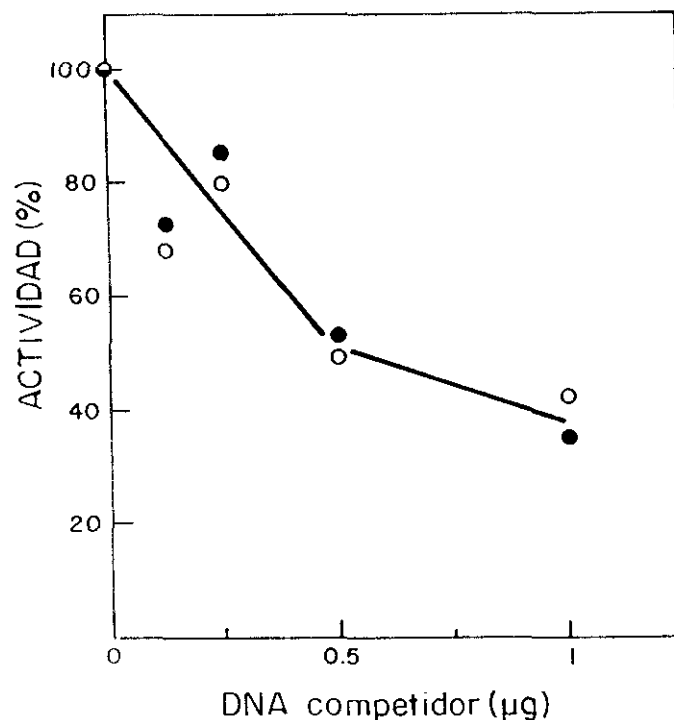


Figura 43. Competición de la actividad de RepB usando DNA de pMV158 y pLS1 como DNA sustrato. El DNA sustrato (500 ng) se mezcló con el DNA competidor manteniendo las siguientes relaciones en masa: 1:0.25, 1:0.5, 1:1 y 1:2, que correspondían a una relación en moléculas de 1:0.2, 1:0.4, 1:0.8 y 1:1.6, respectivamente. Ambos DNAs se incubaron con la proteína RepB (45.5 ng) durante 2 min a 60°C. Como control de actividad de RepB sobre ambos plásmidos se prepararon dos mezclas con cada uno de los plásmidos en ausencia de DNA competidor. Los productos de reacción se analizaron en geles de agarosa, que se cuantificaron directamente. Se representó gráficamente el porcentaje de actividad de RepB sobre el DNA sustrato [pMV158 (○) o pLS1 (●)] a cada una de las concentraciones de DNA competidor ensayadas, corrigiendo los valores para el porcentaje de formas FII inespecíficas observadas en el control sin proteína. Para cada uno de los plásmidos se tomó como valor 100 el porcentaje de actividad de RepB en ausencia de DNA competidor (que correspondió a un 72% para el pMV158 y a un 60% para el pLS1), el resto de los porcentajes obtenidos se refirieron a éste.

Para ello, se prepararon mezclas de reacción que contenían uno de los plásmidos como DNA sustrato (a una cantidad fija de 500 ng) y el otro DNA plasmídico como DNA competidor (con cantidades variables entre 125 y 1000 ng). Las relaciones mantenidas entre ambos DNAs (en masa) fueron las siguientes: 1:0.25, 1:0.5, 1:1 y 1:2, que correspondían a una relación en moléculas de 1:0.2, 1:0.4, 1:0.8 y 1:1.6, respectivamente. Ambos DNAs se incubaron con RepB (45.5 ng) en tampón B y 20 mM MnCl₂, en un volumen final de 30 µl. La incubación se realizó durante 2 min a 60°C y la reacción se paró en hielo con 4 µl de la solución STOP, tras lo cual se mantuvo durante 10 min a t.a. Como control de actividad de RepB sobre ambos plásmidos se prepararon dos mezclas con cada uno de los plásmidos en ausencia de DNA competidor. Los productos de reacción se analizaron en geles de agarosa (1% en TBE y 0.5 µg/ml de EtBr). En este caso, los geles se cuantificaron directamente, calculándose el porcentaje de actividad de RepB sobre el DNA sustrato a cada una de las concentraciones de DNA competidor ensayadas, corrigiendo los valores para el porcentaje de formas FII inespecíficas observadas en el control sin proteína. Para cada uno de los plásmidos se tomó como valor 100 el porcentaje de actividad de RepB en ausencia de DNA competidor (que correspondió a un 72% para el pMV158 y a un 60% para el pLS1), refiriéndose a este valor los demás porcentajes obtenidos. Como se puede observar, la proteína RepB no reconoció con mayor afinidad a uno u otro de los plásmidos analizados (Fig. 43).

13. ACTIVIDAD DE RepB SOBRE OLIGONUCLEÓTIDOS MONOCATENARIOS

RepB introduce un corte específico en el DNA de pLS1 superenrollado entre los nucleótidos G (448) y A (449) (de la Campa *et al*, 1990) localizados en el lazo monocatenario de H-I, que se encuentra dentro de la región *nic* del *dso* de pLS1. Dado que: i) la replicación *in vitro* de pLS1 requiere DNA superenrollado como molde (del Solar *et al*, 1987b); ii) RepB no digiere DNA lineal (ver más adelante); y iii) el grado de superenrollamiento parece influenciar la efectividad de RepB sobre su sustrato (véase Fig. 63), es lógico suponer que para la iniciación de la replicación es necesaria la extrusión de H-I y la exposición de la región de corte como ssDNA.

Dado que el empleo de DNA superenrollado como molde sólo proporciona una información parcial sobre los requerimientos de sustrato de RepB, decidimos realizar ensayos para conocer la actividad *in vitro* de la proteína RepB sobre oligonucleótidos monocatenarios. Para ello, se sintetizó un oligonucleótido de 23-mer ("oligo wt": 5'-GGGGGGGGCTACTACG/ACCCCCC-3') que contiene la secuencia silvestre de la región que rodea el sitio de corte de RepB (/). Este oligo se marcó en su extremo 5'-terminal con la T4 PNK y [γ - 32 P]dATP. El "oligo wt" marcado (2.5 pmol) se incubó con RepB (9.3 pmol; relación DNA:proteína en moléculas de 1:3.7) en tampón B y 20 mM MnCl₂ (volumen final de 60 μ l), durante 30 min a 37, 45 y 60°C. La reacción se paró con proteinasa K (320 μ g/ml, 20 min a 37°C), y los productos de reacción se analizaron en un gel 20% PAA/8 M urea. Si RepB reconoce la secuencia de corte sobre ssDNA y es capaz de cortarlo entre los nt G (15) y A (16), se detectará un oligo marcado de 15-mer, que será el producto de corte. Los resultados mostraron la aparición de una banda de este tamaño en todas las muestras tratadas con RepB (Fig. 44A). En el control no tratado, se observan dos bandas de aproximadamente igual intensidad que corresponden al "oligo wt", ya que ambas bandas son sustrato de la proteína. La aparición de estas dos bandas no se corrigió con la purificación del oligo por HPLC. Por otro lado, cuando estas bandas se extrajeron de geles de PAA, no se obtuvo ninguna actividad de RepB sobre este sustrato. En principio, asumimos que ambas bandas corresponden a distintas estructuras generadas en el oligo, debido a posibles apareamientos intracatenarios entre los nt (G)₇ localizados en el extremo 5'-terminal del "oligo wt" y los (C)₇ situados en su extremo 3'. Los resultados permiten concluir que RepB es capaz de digerir ssDNA que contenga su secuencia de corte. Sin embargo, no se puede descartar que sea necesario la generación de estructuras secundarias, por apareamientos intracatenarios, para que la proteína corte su sustrato.

Para evitar la formación de estructuras secundarias, se probó la actividad de RepB sobre un oligonucleótido de 23-mer que contiene el sitio de corte de la proteína, pero en el cual, no se pueden formar estructuras secundarias por apareamientos intracatenarios ("oligo C": 5'-TGCTTCCGTACTACG/ACCCCCCA-3'). El "oligo C" se marcó en su extremo 5'-terminal como en el caso anterior y, 2.5 pmol de este oligo se trataron con dos concentraciones distintas de RepB (18.6 y 27.8 pmol; relaciones DNA:proteína en moléculas de 1:7.4 y 1:11, respectivamente). Las

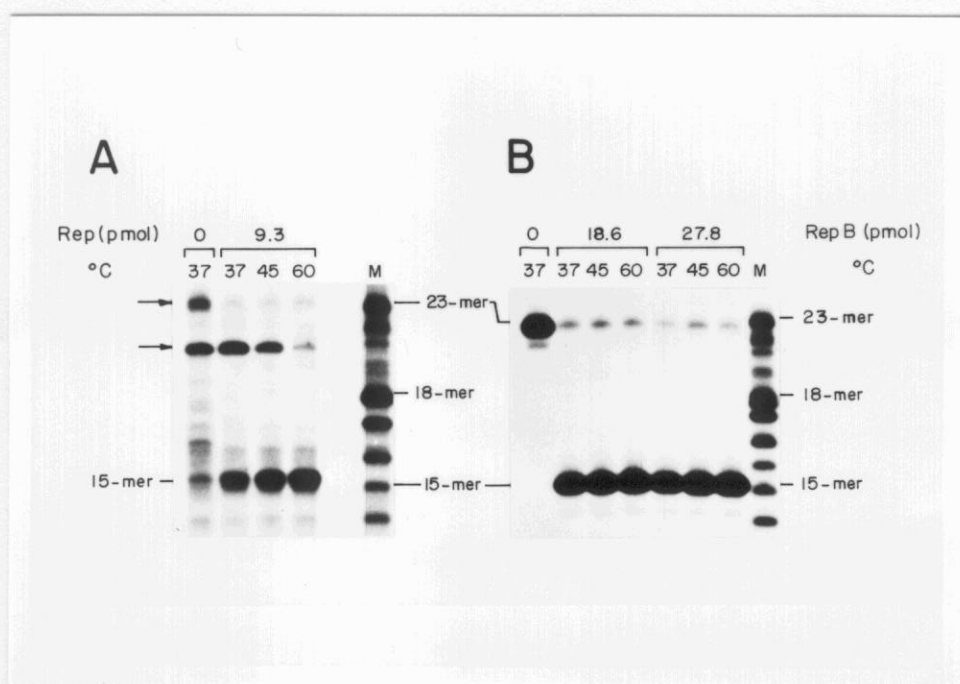


Figura 44. Actividad de RepB sobre oligonucleótidos monocatenarios. **A.** El "oligo wt" (23-mer: 5'-GGGGGGGCTACTACG/ACCCCCC-3') que contiene la región *nic* del *dso* de pLS1 y el sitio de corte (/) de la proteína RepB, se marcó en su extremo 5' con la T4 PNK. El oligo marcado (2.5 pmol) se incubó con RepB (9.3 pmol) durante 30 min a 37, 45 y 60°C. Las flechas indican las bandas correspondientes a distintas estructuras formadas por el "oligo wt". Como producto de corte de RepB sobre el "oligo wt" se obtuvo una banda de 15-mer. **B.** El "oligo C" (23-mer: 5'-TGCTCCGTACTACGACCCCCCA-3') se marcó en su extremo 5' y se trató con dos concentraciones distintas de RepB (18.6 y 27.8 pmol) a las temperaturas indicadas. Se observa una única banda de 23-mer y como producto de corte, la banda de 15-mer señalada. M: marcadores de tamaño molecular.

incubaciones y el análisis de las muestras se realizaron como en el caso anterior. En esta ocasión, se pudo observar una única banda en el control sin proteína y la aparición de una banda de 15-mer en las muestras tratadas con RepB, como resultado de su actividad de corte sobre el "oligo C" (Fig. 44B). Se comprobó que las bandas detectadas en la parte inferior del gel del "oligo wt" (tanto en las muestras tratadas con proteína o no; Fig. 44A) no se debían a una posible contaminación con una exonucleasa en la preparación de RepB. Para ello, se preparó una mezcla del "oligo wt" (1.25 pmol) con RepB (1.8 pmol) en tampón B, suplementado esta vez con 5 mM $MgCl_2$ (ya se había comprobado que la actividad de RepB es dependiente de $MnCl_2$ y no de $MgCl_2$) y se incubó 30 min a 37°C. Como control, se preparó una mezcla similar sin ningún catión que fue incubada de la misma forma. Tras la incubación, las

muestras se trataron con proteinasa K (125 $\mu\text{g/ml}$) y se precipitaron con etanol, analizándose después en un gel 8% PAA/7 M urea. No se observó ninguna variación de las bandas inferiores a 15-mer entre el control y la mezcla con MgCl_2 (no se muestra). Concluimos, que dichas bandas no se deben a ninguna actividad exonucleásica contaminante de la preparación de RepB, sino que pueden ser formas truncadas del oligo originadas durante su síntesis.

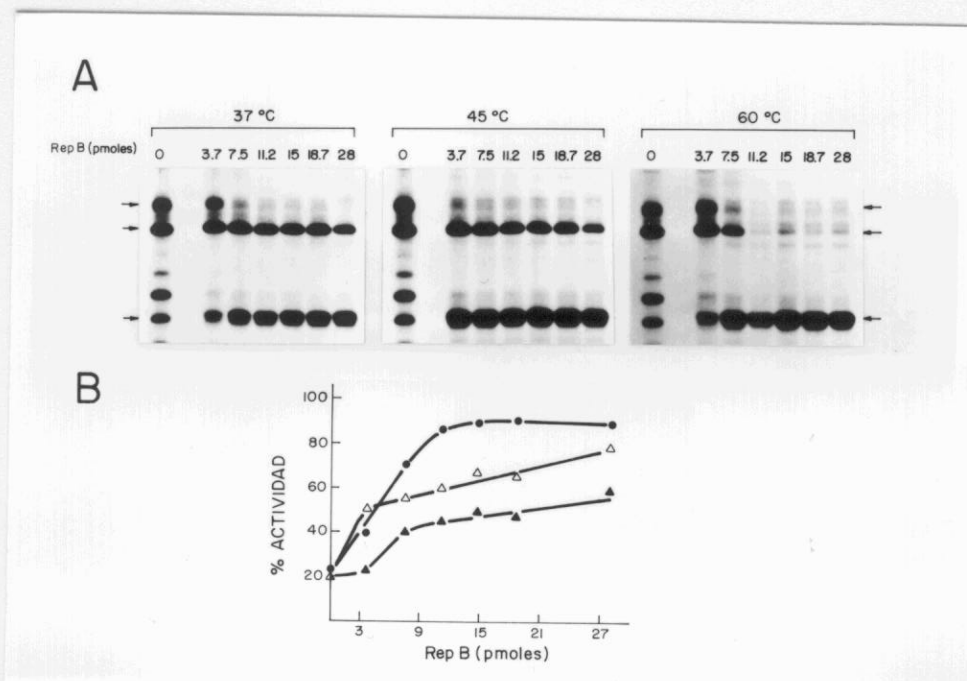


Figura 45. Actividad de RepB sobre oligonucleótidos en función de la concentración de proteína. **A.** El "oligo wt" de 23-mer, marcado en su extremo 5' (3.7 pmol) se incubó durante 30 min con distintas concentraciones de proteína RepB (3.7, 7.5, 11.2, 15, 18.7 y 28 pmol) a las temperaturas de 37, 45 y 60°C. Se incluyeron controles no tratados con RepB. Los productos de reacción se analizaron en geles de PAA 20%/8 M urea y se cuantificó el porcentaje de actividad de la proteína RepB en las distintas muestras, descontando el valor obtenido para la banda que aparece en el control no tratado y que comigra con la banda de 15-mer, producto de la actividad de corte de RepB. **B.** Se muestra la representación gráfica del porcentaje de actividad de RepB sobre ssDNA para cada una de las concentraciones ensayadas.

Para definir mejor la actividad *in vitro* de RepB sobre ssDNA, se realizaron tres ensayos a 37, 45 y 60°C, con distintas concentraciones de proteína (3.7, 7.5, 11.2, 15, 18.5 y 28 pmol) utilizando el "oligo wt" de 23-mer (3.75 pmol). Las relaciones en moléculas DNA:proteína utilizadas fueron las siguientes: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 y 1:7.5. Las reacciones con RepB se realizaron del modo habitual y, tras el análisis de los productos de reacción se realizó una cuantificación de las muestras (Fig. 45) para

calcular el porcentaje de actividad (corte) de RepB. Los cálculos se corrigieron para el valor de la banda de unos 15-mer observable en el control sin proteína. Se comprobó que la actividad de RepB sobre oligos monocatenarios, al igual que ocurre con DNA superenrollado, depende de la temperatura. Las reacciones, sin embargo, parecen ser más eficientes en el caso de los oligos, ya que se alcanzan porcentajes de corte más altos con una menor relación DNA:proteína.

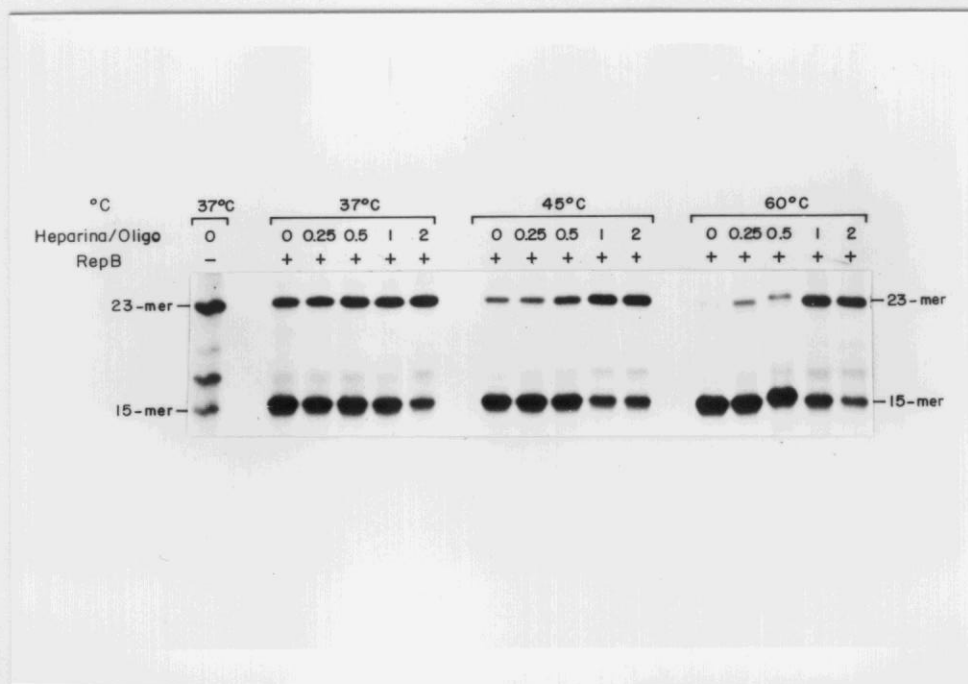


Figura 46. Competición con heparina de la actividad de RepB sobre oligonucleótidos. El "oligo wt" (1.26 pmol, 9.4 ng) se incubó con RepB (4.6 pmol) y distintas cantidades de heparina (2.35, 4.70, 9.41 y 18.82 ng). Se mantuvo una relación DNA:proteína en moléculas de 1:3.7 y las siguientes relaciones heparina/oligo (en masa): 0.25, 0.5, 1 y 2. Las muestras se prepararon por triplicado y se incubaron durante 30 min a 37, 45 y 60°C. Se incluyeron un control negativo [(-)RepB, (-)heparina] y un control positivo [(+)RepB, (-)heparina] para cada una de las temperaturas de incubación. Los productos se analizaron en un gel de 20% PAA/8 M urea.

Por último, se realizó un ensayo de competición para estudiar la actividad de RepB sobre el "oligo wt" en presencia de heparina como competidor. Se prepararon cuatro mezclas de reacción que contenían 1.26 pmol (9.4 ng) del "oligo wt", 4.6 pmol de RepB y distintas cantidades de heparina (2.35, 4.70, 9.41 y 18.82 ng), en presencia del tampón B y 20 mM MnCl_2 (volumen final, 30 μl). Se mantuvo una relación DNA:proteína en moléculas igual a 1:3.7 y las siguientes relaciones DNA:heparina (en

masa): 1:0.25, 1:0.5, 1:1 y 1:2. Las muestras se prepararon por triplicado y se incubaron durante 30 min a 37, 45 y 60°C. Se incluyó un control negativo (sin RepB ni heparina) y un control positivo (con RepB, sin heparina) para cada una de las temperaturas de incubación. Tras la incubación, las muestras se trataron con proteinasa K y se precipitaron con etanol. Los productos se analizaron en un gel de 20% PAA/8 M urea, observándose cierta disminución en la actividad de RepB en presencia de heparina a relaciones superiores 1:0.5, con independencia de la temperatura de reacción (Fig. 46).

14. ESPECIFICIDAD DEL SITIO DE CORTE DE RepB

Para determinar la especificidad de RepB sobre su sitio de corte se realizaron ensayos de actividad, empleando como sustratos distintos oligonucleótidos monocatenarios de 23-mer, en los que se introdujeron cambios en las bases del sitio de corte (G15/A16) y en algunas próximas. Todos los oligos fueron marcados en su extremo 5', incubándose cada uno de ellos (1.3 pmol) con RepB (9.3 pmol) durante 30 min a 37, 45 y 60°C (relación en moléculas DNA:proteína igual a 1:7.3). Los productos de reacción se analizaron y cuantificaron como antes. Para cada caso, se calculó el porcentaje de actividad de RepB que fue referido al valor obtenido con el "oligo wt" (considerado como valor 100). También se incluyó un oligonucleótido con la secuencia complementaria a la región de corte (oligo "comp") para comprobar la especificidad de secuencia de la proteína RepB. Los resultados muestran (Tabla 8) que a 5' del sitio de corte (G15/A16), el único cambio de base permitido fue G15→A, aunque se observó una reducción en el porcentaje de productos de corte por la proteína (más del 50%). A 3' del sitio de corte se pudo cambiar la A16 por una C (sin cambio significativo en la actividad de corte) o por una T (con una pequeña reducción en la actividad proteica). Sorprendentemente, RepB no tuvo actividad sobre el oligo que llevaba el cambio de C17→G, ya que se pensaba que el grupo C₇ a 3' del sitio de corte sólo estaba implicado en la generación de la H-I sobre DNA superenrollado mediante apareamiento con el grupo G₇ del extremo 5'. Los resultados mostraron que el nt de la posición 17 (C17) es importante en el reconocimiento de la secuencia de corte. RepB tampoco reconoció el "oligo B" (que contiene el cambio

C17→ G aunque sí puede generar una estructura secundaria) y sí presentó actividad frente al "oligo C" (que no puede formar estructuras secundarias y mantiene la C17). Como era de esperar, la proteína RepB no reconoció la secuencia complementaria al sitio de corte (oligo "comp"), lo cual demuestra la especificidad de secuencia de RepB. A partir de los resultados mostrados en este y en el anterior Apartado, podemos concluir: i) RepB es capaz de actuar sobre ssDNA; ii) la proteína no requiere la generación de estructuras secundarias cuando el sustrato está en forma monocatenaria; iii) RepB tiene actividad específica de secuencia, y iv) RepB reconoce la siguiente secuencia consenso de 9 nt: 5'-TACTACR/HC-3' (siendo R = base púrica y H = cualquier base excepto G).

Tabla 8. Especificidad del sitio de reconocimiento de RepB. Actividad de la proteína RepB sobre un oligonucleótido de 23-mer que contiene la región *nic* de pLS1 ("oligo wt"), sobre oligos de 23-mer con los cambios de base indicados (cajas) o sobre un oligo con la secuencia complementaria al oligo wt ("oligo comp"). El porcentaje de actividad en cada caso se refirió al valor obtenido para el "oligo wt" (ver texto).

Oligo	Secuencia (5'-3')	Porcentaje de corte		
		37°C	45°C	60°C
wt	GGGGGGGCTACTACG / ACCCCCCC	100	100	100
G15/A	GGGGGGGCTACTAC A / ACCCCCCC	41	48	30
G15/C	GGGGGGGCTACTAC C / ACCCCCCC	<10	<10	<10
G15/T	GGGGGGGCTACTAC T / ACCCCCCC	<10	<10	<10
A16/T	GGGGGGGCTACTACG / T CCCCCCC	100	95	100
A16/C	GGGGGGGCTACTACG / C CCCCCCC	64	62	66
A16/G	GGGGGGGCTACTACG / G CCCCCCC	<10	<10	<10
C17/G	GGGGGGGCTACTACG / A G CCCCC	<10	<10	<10
C17C18/GG	GGGGGGGCTACTACG / A GG CCCCC	<10	<10	<10
comp.	GGGGGGG T / CGTAGTAG CCCCCCC	<10	<10	<10
B	C C C C CTACTACG / A G G G G	<10	<10	<10
C	T G C T C C G TACTACG / ACCCCCC A	140	106	101
consensus		TACTACR/HC		

En la replicación por el mecanismo RC, tras el corte y generación del extremo 3'-OH mediado por la proteína iniciadora, se postula que la cadena parental iría siendo desplazada por una helicasa del huésped mientras que el ssDNA generado estaría cubierto por la proteína SSB. Dado que las proteínas Rep intervienen también en la reacción de cierre entre moléculas de ssDNA en la terminación de la síntesis de la hebra líder (Rasooly y Novick, 1993), quisimos saber si RepB sería capaz de reconocer y actuar sobre un oligonucleótido monocatenario cubierto por SSB y que contenga el sitio de corte de RepB. Para ello, se utilizó el oligonucleótido de 26-mer (5'-GGGGCTACTACG/ACCCCCCTATAGT-3') marcado en su extremo 5' y que contiene el sitio de corte de RepB (/). Se calculó que serían necesarios 42.6 ng de SSB para cubrir totalmente 1.26 pmol (10.6 ng) del oligo de 26-mer. Se utilizó tampón B con 10 mM MgCl₂, si bien el tampón recomendado es algo diferente (50 mM Tris-



Figura 47. Actividad de RepB sobre un oligonucleótido monocatenario en presencia de SSB. El oligo de 26-mer (5'-GGGGCTACTACG/ACCCCCCTATAGT-3') marcado en 5' (1.26 pmol; 10.6 ng) se incubó con la proteína SSB (42.6 ng), durante 30 min a 20°C. Posteriormente, las muestras se trataron (+) o no (-) con RepB (137.5 ng), durante 30 min a 37°C, y se paró la reacción con 0.6 µg/µl de proteína K. Las muestras se analizaron en un gel 20% PAA nativo. Se indican los tamaños de las bandas observadas.

HCl, pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 200 mM NaCl y 50% glicerol). Para cubrir el oligonucleótido con SSB se preparó una mezcla inicial que contenía 5 pmol (42 ng) del oligo de 26-mer y 170.6 ng de la proteína SSB, en un volumen de reacción de 10 μ l. La mezcla se incubó durante 30 min a 20°C y se repartió en 4 tubos: el tubo 1 se incubó directamente durante 30 min a 20°C, al tubo 2 se le añadió 20 mM MnCl₂ y se incubó 30 min a 20°C, y a los tubos 3 y 4 se les añadió 20 mM MnCl₂ y la proteína RepB (137.5 ng). Las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C, y después el tubo 4 fue tratado con 0.6 μ g/ μ l de proteinasa K (10 min a 37°C). Como controles se incluyeron muestras tratadas o no con RepB en ausencia de SSB. Tras añadir el tampón de carga BXGE, las muestras se analizaron en un gel 20% PAA nativo. No observamos ninguna diferencia entre las muestras tratadas o no con SSB, aunque se pudo comprobar que RepB en presencia de SSB, mantiene su actividad sobre el oligonucleótido de 26-mer, generando como producto de corte una banda visible de 12-mer (Fig. 47). Se puede concluir que, aunque la actividad de corte de RepB es competitiva por heparina, RepB sí es capaz de desplazar SSB para actuar específicamente sobre su sitio de corte.

15. RepB NO PRESENTA ACTIVIDAD DETECTABLE SOBRE DNA LINEAL BICATENARIO

Hasta ahora conocemos la actividad de RepB sobre DNA plasmídico superenrollado y sobre oligonucleótidos monocatenarios, lo cual nos permite apoyar la hipótesis de que es necesaria la extrusión de H-I (que comprende la región *nic* del *dso* de pLS1) para que la secuencia de corte (5'-TACTACG/AC-3') de la proteína RepB se exponga como ssDNA y pueda ser reconocida por RepB. Si esto fuese cierto, la proteína RepB no presentaría actividad sobre DNA lineal bicatenario que contenga la secuencia de corte, ya que en estas moléculas no se generan estructuras secundarias. Igualmente, nos interesaba conocer si la proteína RepB actuaba siempre en el mismo sitio sin que existiese variación alguna por la temperatura de incubación (hay que recordar que RepB presentó su mayor porcentaje de actividad a 60°C, temperatura muy superior a la fisiológica).

En un primer ensayo se utilizó DNA de pMV158 (1 μ g) que se mezcló con RepB (86 ng), en tampón B y 20 mM MnCl₂, en un volumen final de 10 μ l. Se realizó una incubación de 30 min a 45 y 60°C. Las reacciones se pararon con proteinasa K y se dializaron frente a tampón para la digestión con *Hind*III. Por otro lado, la misma cantidad de DNA plasmídico (1 μ g) se digirió con *Hind*III (este enzima presenta un sitio único de corte en pMV158) durante 2 h a 37°C. El enzima se inactivó por calor y el DNA digerido se dializó frente a tampón B, siendo a continuación tratado con RepB (120 ng) durante 30 min a 60°C. Esta reacción se paró con proteinasa K durante 10 min a 20°C. Se incluyeron como controles DNA de pMV158 digerido con *Hind*III (DNA lineal 5.5 kb) y con *Pst*I (dos fragmentos de 1 y 4.5 kb). Tras la digestión con RepB y/o con los enzimas de restricción, las muestras se precipitaron con etanol y el precipitado se disolvió directamente en 5 μ l de una mezcla con 50 mM NaOH y 1 mM EDTA, a la cual se le añadieron otros 5 μ l del colorante para geles desnaturalizantes. Las muestras se analizaron por electroforesis en geles alcalinos de agarosa, y el DNA se transfirió a membranas de nitrocelulosa. Los filtros se hibridaron con DNA de pLS1 linearizado con *Eco*RI y marcado con [α -³²P]dCTP. Las muestras tratadas con RepB y con *Hind*III deberían dar origen a tres bandas de aproximadamente 1.5, 4 y 5.5 kb. No obstante, ya en el control no tratado con RepB se observaron más bandas de las esperadas (Fig. 48A; calle 1). Estas bandas pueden deberse a formas FII generadas por la proteína Mob de pMV158 (complejos de relajación pre-existentes y que copurificarían con las formas FI), o quizás a la existencia de un sitio semejante a la secuencia de corte de RepB alrededor de la coordenada 3860 de pMV158 (5'-AACTACGAG-3'). Si bien esta secuencia podría estar en el lazo de una estructura secundaria, presenta una G en posición 17, la cual no sería reconocida por RepB (Tabla 8). En cualquiera de los dos casos, se estarían generando nuevas bandas en las muestras no tratadas con RepB. En las muestras tratadas con RepB se observó una banda nueva con respecto al control, que corresponde a la banda esperada de 1.5 kb (Fig. 48A; calles 2 y 3). Además, no se observó actividad de RepB sobre DNA de pMV158 linearizado con *Hind*III, ya que las bandas detectadas aparecen en el control (Fig. 48A; calle 4). Para intentar evitar alguna posible interpretación artefactual (bandas no esperadas), y como comprobación de que RepB no actúa sobre DNA lineal, se repitió el ensayo usando DNA de pLS1 (Δ mob, y sin la secuencia semejante al sitio de corte), en condiciones similares a las

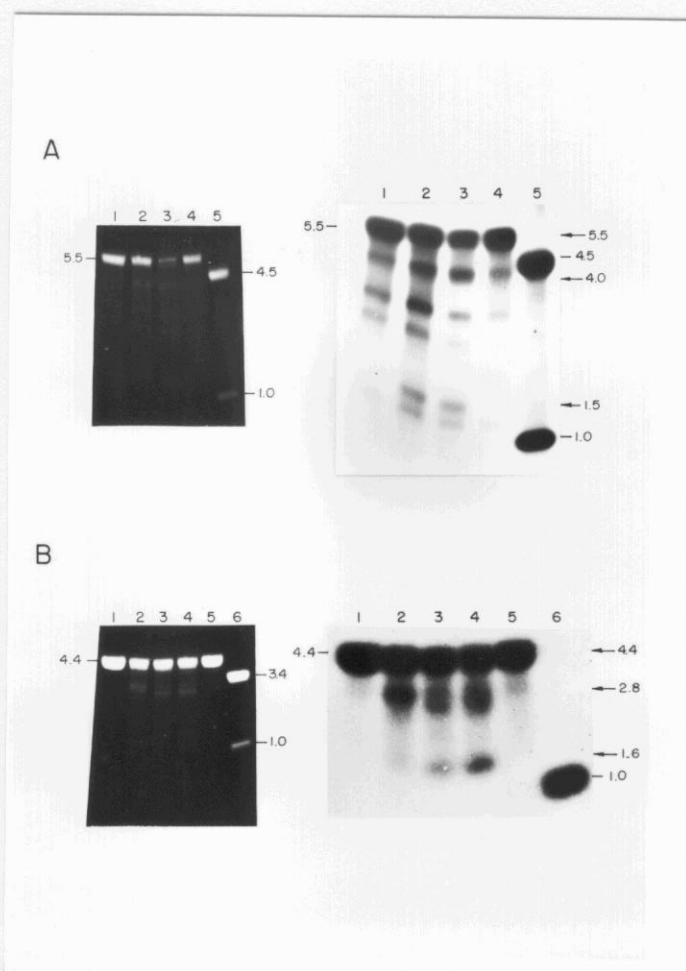


Figura 48. Actividad de RepB sobre DNA lineal y análisis de los productos de reacción en geles de agarosa alcalinos. **A.** Muestras de DNA de pMV158 (1 μ g) se incubaron con RepB (86 ng) durante 30 min a 45 (2) y 60°C (3), se dializaron frente a tampón *Hind*III y se sometieron a digestión con esta enzima de restricción. Una de las muestras (4) se linearizó primero con *Hind*III, se dializó frente al tampón B y posteriormente, se trató con RepB (120 ng) durante 30 min a 60°C. Como controles se utilizaron: pMV158/*Hind*III (1; DNA lineal 5.5 kb) y pMV158/*Pst*I (5; fragmentos de 1 y 4.5 kb). Tras la digestión o el tratamiento con RepB, todas las muestras se precipitaron con etanol y se analizaron en un gel de agarosa al 0.8% alcalino (panel izquierdo). El DNA se transfirió a un filtro de nitrocelulosa y se hibridó con DNA de pLS1/*Eco*RI marcado con [α - 32 P]dCTP (panel derecho). Tras la digestión con *Hind*III, las muestras tratadas con RepB deberían dar origen a tres bandas (\rightarrow) de aproximadamente 1.5, 4 y 5.5 kb (ver texto). **B.** DNA de pLS1 (1 μ g) se incubó con RepB (86 ng) a 37 (2), 45 (3) y 60°C (4), se dializó frente al tampón del enzima de restricción y se sometió a digestión con *Hind*III. Una de las muestras (5) se trató con RepB a 60°C, después de ser linearizada con *Hind*III. Las muestras se precipitaron con etanol y se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa alcalino a 4°C, con recircularización del tampón (panel izquierdo). El DNA se transfirió a un filtro de nitrocelulosa y se hibridó con DNA de pCGA7 marcado con [α - 32 P]dCTP. Se incluyó DNA pLS1/*Hind*III (1; DNA lineal 4.4 kb) y pLS1/*Pst*I (6; fragmentos de 1 y 3.4 kb; sólo el fragmento pequeño puede hibridar con el DNA de pCGA7). Las muestras tratadas con RepB y digeridas con *Hind*III darían lugar a tres bandas (\rightarrow) de 1.6, 2.8 y 4.4 kb que pueden hibridar con pCGA7. Se comprueba que RepB no es capaz de actuar sobre DNA lineal (ver texto).

de pMV158. En este segundo ensayo se incluyó, además, una muestra tratada con RepB a 37°C. La electroforesis se realizó a 4°C y con recircularización del tampón. Tras la transferencia del DNA a una membrana de nitrocelulosa, se realizó una hibridación con DNA de pCGA7 marcado con [α -³²P]dCTP como sonda (sólo hibridan aquellos fragmentos que lleven las Horquillas I y II del *dso* de pLS1). Se incluyó DNA pLS1 digerido con *Hind*III (fragmento lineal de 4.4 kb) o con *Pst*I (dos fragmentos de 1 y 3.4 kb, aunque sólo el fragmento pequeño puede hibridar con el DNA de pCGA7). Las muestras tratadas con RepB y digeridas con *Hind*III darían lugar a tres bandas de 1.6, 2.8 y 4.4 kb; la banda de 2.8 kb hibridaría con 60 pb del pCGA7 y la banda de 1.6 kb podría hibridar con 130 pb del pCGA7. Los resultados obtenidos (Fig. 48B) indican, en primer lugar, que RepB no es capaz de actuar sobre DNA lineal, ya que no se observa ningún cambio de la muestra pLS1/*Hind*III tratada con RepB respecto al control no tratado (Fig. 48B; calles 5 y 1, respectivamente). En segundo lugar, comprobamos que RepB corta en el sitio adecuado a las tres temperaturas ensayadas, ya que la variación que se observa en la intensidad de la banda pequeña (de aproximadamente 1.6 kb) a las tres temperaturas, se corresponde con el porcentaje de actividad que presenta RepB a cada una de esas temperaturas (menor actividad a 37°C y mayor a 60°C).

Aprovechando la capacidad de la proteína RepB para cortar oligonucleótidos monocatenarios, se realizó un ensayo para confirmar que la proteína carece de actividad sobre un oligo dsDNA que contenga su sitio de corte. El sustrato de RepB se consiguió hibridando 0.3 nmol del "oligo wt" (23-mer: 5'-GGGGGGGCTACTAC G/ACCCCCCCC-3') marcado en su extremo 5'-terminal con 0.9 nmol de un oligo con la secuencia complementaria (oligo "comp", 23-mer: 5'-GGGGGGGT/CGTAGTAGC CCCCCC-3') en presencia de 0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 1 mM EDTA, en un volumen final de 20 μ l. La mezcla se incubó durante 10 min a 95°C y el anillamiento se realizó dejando enfriar lentamente hasta t.a. Para comprobar que todo el "oligo wt" estaba hibridado con el oligo "comp", se analizaron muestras de los oligos ssDNA y dsDNA, en un gel de 20% PAA en condiciones no desnaturizantes. Se pudo observar (Fig. 49A) que todo el "oligo wt" estaba hibridado con el oligonucleótido "comp" y que la forma bicatenaria del oligo de 23-mer migra más lentamente que la forma monocatenaria. Una vez obtenido el sustrato dsDNA, se

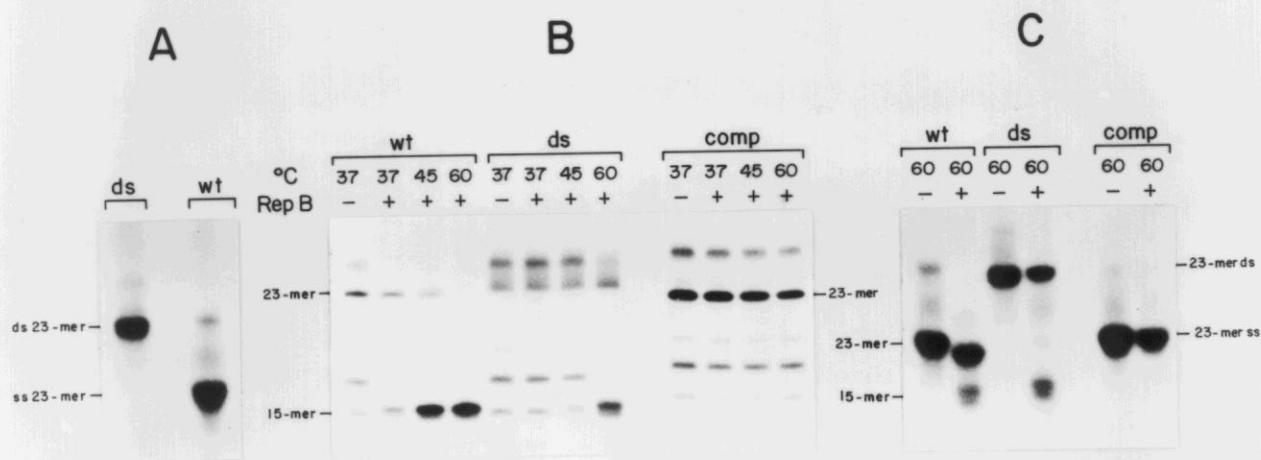


Figura 49. Actividad de RepB sobre un oligonucleótido bicatenario que contiene la región *nic* del *dso* de pLS1. **A.** El "oligo wt" (23-mer: 5'-GGGGGGGCTACTACGACCCCCC-3') se hibridó con el "oligo comp" (23-mer: 5'-GGGGGGGTCGTAGTAGCCCCC-3') dando como resultado un oligo bicatenario de 23 pb ("oligo ds"). Muestras del oligo ssDNA y dsDNA se analizaron en un gel 20% PAA nativo. Se observa que el "oligo ds" migra más lentamente que el ssDNA. **B.** Ensayos de actividad de RepB (28 pmol) con 7.5 pmol de los oligos "wt", "comp" y "ds" durante 30 min a 37, 45 y 60°C. La mitad de las muestras se analizó en un gel 20% PAA/8 M urea. Se indica la posición de la banda de 15-mer, producto de la actividad de corte de RepB. **C.** Muestras de la actividad de RepB sobre los oligos "wt", "comp" y "ds" a 60°C se analizaron en un gel 20% PAA nativo. Se puede observar que la banda que se originó tras el corte de RepB en el "oligo ds" (y que debería ser bicatenaria) migra a la misma altura que la banda de 15-mer (monocatenaria) producto de la actividad de corte sobre el "oligo wt".

realizaron ensayos de actividad con RepB, incubando 7.5 pmol de los oligos "wt", "comp" y "ds" (oligo bicatenario) con 28 pmol de RepB, en tampón B con 20 mM $MnCl_2$, en un volumen final de 90 μ l. Las muestras se incubaron durante 30 min a 37, 45 y 60°C, se trataron con proteinasa K y se precipitaron con etanol. La mitad de las muestras se analizó en un gel 20% PAA/8 M urea (Fig. 49B), donde se pudo observar cierta actividad de RepB sobre el "oligo ds" a 60°C y ninguna actividad sobre el oligo

"comp". Esta actividad residual de RepB sobre el "oligo ds" podría deberse a desnaturalización parcial por incubación a 60°C. Por ello, la otra mitad de las muestras tratadas con RepB a 60°C se analizaron en un gel 20% PAA nativo (Fig. 49C), lo que nos permitió comprobar que la banda originada por RepB sobre el "oligo ds" (y que debería ser bicatenaria) migraba a la misma altura que la banda de 15-mer (monocatenaria), producto de la actividad de corte sobre el "oligo wt". Por lo tanto, se puede concluir: i) RepB es incapaz de digerir dsDNA en forma lineal, y ii) la actividad residual de RepB sobre el "oligo ds" a 60°C, se debe a desnaturalización parcial del oligo.

16. RepB TIENE ACTIVIDAD NUCLEOTIDIL-TRANSFERASA. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE CIERRE DE RepB SOBRE OLIGONUCLEÓTIDOS

En apartados anteriores ya se ha demostrado que RepB es capaz de cortar (produciendo formas FII) y luego cerrar (generando formas FI') DNA superenrollado, lo cual nos sugiere que la proteína debe tener algún papel en la terminación de la replicación plasmídica. Según el vigente modelo (Rasooly y Novick, 1993), la terminación se produciría mediante un corte entre la cadena parental(+) y la de nueva síntesis, el cierre de la cadena nueva y la unión de los extremos de la cadena (-) desplazada. Para saber si RepB era capaz de cerrar el corte previamente generado sobre oligonucleótidos monocatenarios, se mezclaron dos oligos de diferente tamaño (23-mer: 5'-GGGGGGGCTACTACG/ACCCCCCCC-3' y 26-mer: 5'-GGGGCTACTACG/ACCCCCCCTATAGT-3'), que contienen el sitio de corte de la proteína (/) situado a distintas distancias de sus extremos. Ambos oligonucleótidos se marcaron en su extremo 5', y 1.26 pmol de cada oligo marcado se mezcló por separado con una cantidad doble (2.52 pmol) del otro oligonucleótido sin marcar. Las mezclas se trataron con dos concentraciones distintas de RepB (1.2 y 2.3 pmol) en tampón B y 20 mM MnCl₂, en un volumen final de 30 µl. Las muestras se incubaron durante 30 min a las temperaturas de 37, 45 y 60°C, se trataron con proteinasa K y se precipitaron con etanol antes de ser analizadas en un gel 20% PAA/8 M urea. Si RepB puede realizar una reacción de corte/cierre sobre los oligonucleótidos, se detectará una nueva banda, que será el producto del intercambio de los extremos 5'

y 3' generados tras el corte por RepB. Esta banda será de 29-mer cuando el oligo marcado sea el de 23-mer, y de 20-mer, cuando se utilice el oligo de 26-mer marcado, según se esquematiza en la Figura 50. Los resultados mostraron que, en ambos casos, se obtuvieron las bandas esperadas como productos de la actividad de corte/cierre y de intercambio de hebra de la proteína RepB sobre los oligonucleótidos (Fig. 50).

Oligonucleótidos iniciales:

(23-mer) : GGGGGGGCTACTACG/ACCCCCC-OH
 (26-mer) : GGGGCTACTACG/ACCCCCCTATAGT-OH

Productos de corte:

(15-mer) : GGGGGGGCTACTACG-OH
 (14-mer) : ACCCCCCCTATAGT-OH
 (12-mer) : GGGGCTACTACG-OH
 (8-mer) : ACCCCCC-OH

Productos de cierre:

(29-mer) : GGGGGGGCTACTACG/ACCCCCCTATAGT-OH
 (26-mer) : GGGGCTACTACG/ACCCCCCTATAGT-OH
 (23-mer) : GGGGGGGCTACTACG/ACCCCCC-OH
 (20-mer) : GGGGCTACTACG/ACCCCCC-OH

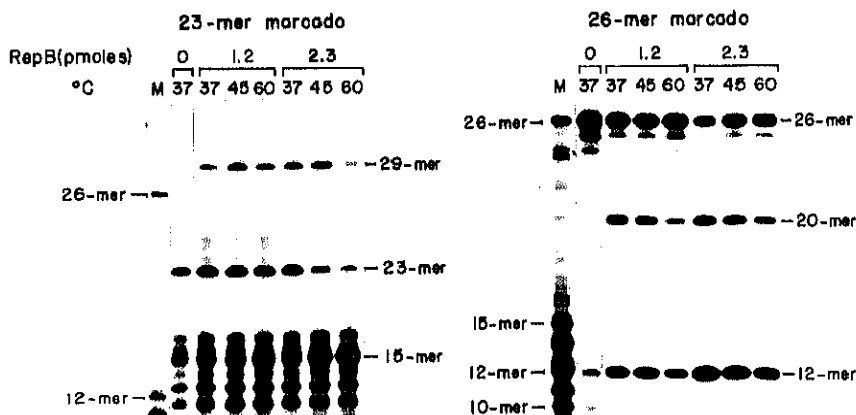


Figura 50. Actividad nucleotidil-transferasa de RepB. Oligonucleótidos de 23-mer y 26-mer, que contienen el sitio de corte de RepB en distinta posición, se marcaron en sus extremos 5'-terminal con la T4 PNK. Cada uno de los oligos marcados (1.26 pmol) se mezcló por separado con 2.52 pmol del otro oligo sin marcar, y se trataron con dos concentraciones de RepB (1.2 y 2.3 pmol) durante 30 min a 37, 45 y 60°C. Los productos de reacción se analizaron en un gel 20% PAA/8 M urea. Si RepB puede realizar una reacción de corte/cierre e intercambio de hebra entre ambos oligos, se debe generar una nueva banda en cada caso (de 29-mer cuando se usa el oligo de 23-mer marcado, y de 20-mer, si el oligo marcado es el de 26-mer).

Para caracterizar con más detalle la actividad de cierre de RepB, se realizaron otros ensayos que se describen a continuación:

a) 1.26 pmol del oligo 15-mer marcado en su extremo 5'-terminal (5'-³²pGGGGGGGGCTACTACG_{OH}-3'; es decir, la mitad izquierda del sitio de corte de RepB con su extremo pG-OH), se mezcló con 1.26 pmol del oligo 8-mer fosforilado (5'-pACCCCCCCC_{OH}-3'; la mitad derecha del sitio de corte de RepB con su extremo pAp). La mezcla se trató con dos concentraciones de RepB (1.2 y 2.3 pmol), incubándose durante 30 min a 37, 45 y 60°C. Los productos se analizaron en un gel 20% PAA/ 8 M urea. Si RepB fuese capaz de unir covalentemente las dos mitades de su región de corte, se debería generar una banda de 23-mer. No obstante, los resultados no mostraron la aparición de una nueva banda de 23-mer (Fig. 51A). Por tanto, concluimos que la reacción de corte del sustrato por RepB debe producirse previamente a la reacción de cierre.

b) Se realizó un ensayo similar al anterior, en el que se incubó el oligo 8-mer marcado (1.26 pmol) con el oligo 15-mer fosforilado (1.26 pmol) y tres concentraciones distintas de RepB (2.3, 4.6 y 9.3 pmol). Como en el caso anterior, si RepB pudiese unir las dos mitades del sitio de corte, se generaría una banda de 23-mer (producto de la unión de ambos oligos). De nuevo, no se observó la aparición de una banda nueva tras la incubación con RepB (resultado no mostrado).

c) Para comprobar que la reacción de cierre sólo se puede producir si RepB ha cortado previamente su sustrato específico, se mezcló el oligo 15-mer marcado (1.26 pmol) con igual cantidad del oligo 26-mer marcado (5'-p*GGGGCTACTACG/ACCCCCCTATAGT_{OH}-3'; que contiene el sitio de corte completo; p* indica el fosfato marcado radiactivamente) y se trató con RepB (1.2 y 2.3 pmol) a 37, 45 y 60°C. El análisis de los resultados mostró que la actividad de corte de RepB sobre el oligo 26-mer genera una banda de 12-mer. Además, se pudo observar la aparición de una nueva banda de 29-mer, que sería producto de la unión covalente del oligo 15-mer con la mitad derecha (14-mer) del oligo 26-mer, liberada tras el corte de RepB en este oligo (Fig 51B).

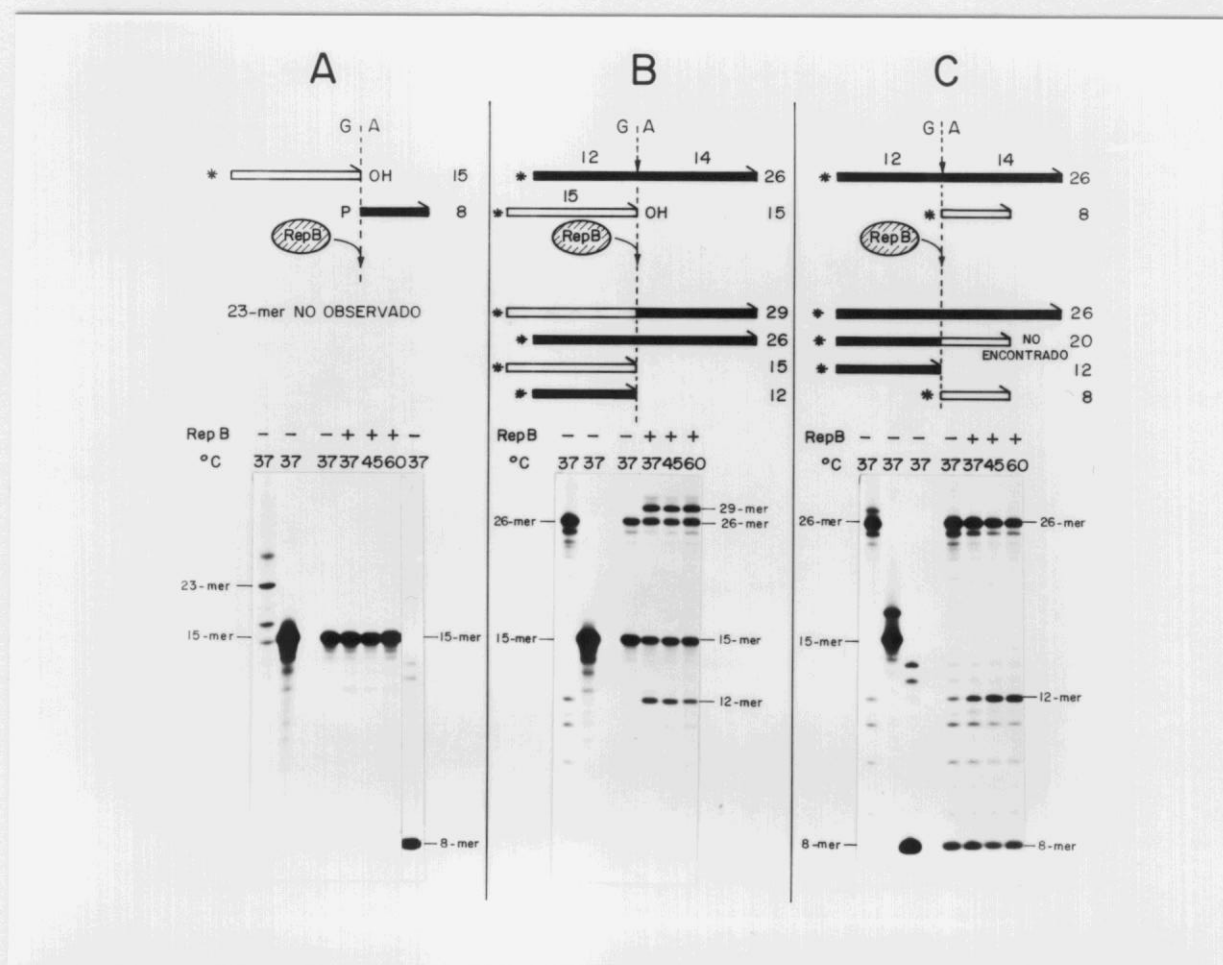


Figura 51. Análisis de la actividad de cierre de RepB sobre oligonucleótidos. Representaciones esquemáticas de los experimentos realizados y de los resultados esperados. Los extremos 5'-terminales marcados con la T4 PNK (*) o fosforilados (P) se indican en la gráfica. La mezcla de oligonucleótidos (2.52 pmol en total) fueron tratados (+) o no (-) con RepB (1.2 pmol) a las temperaturas indicadas. **A.** Se mezcló el oligo 15-mer marcado en 5' (que contiene la mitad situada a la izquierda del sitio de corte y proporciona el extremo pG-OH) con el oligo 8-mer fosforilado (que contiene la mitad situada a la derecha del sitio de corte) y RepB. No se observó ninguna banda de 23-mer como producto de la actividad de cierre. **B.** Se mezclaron los oligos 15-mer y 26-mer marcados en 5' con RepB. La actividad de corte de RepB sobre el oligo 26-mer genera una banda de 12-mer, y aparece una nueva banda de 29-mer como producto de la unión covalente del oligo 15-mer con la mitad derecha (14-mer) del oligo 26-mer. **C.** La mezcla de los oligos 26-mer y 8-mer marcados en sus extremos 5' se trató con la cantidad ya mencionada de RepB. Si la proteína fuese capaz de unir el oligo 8-mer (con la mitad derecha del sitio de corte) con la mitad izquierda (12-mer) del oligo 26-mer generada tras el corte por RepB, se generaría una nueva banda de 20-mer. No se detectó ninguna banda de 20-mer.

d) Se repitió el ensayo anterior utilizando dos oligos de 15-mer con una secuencia distinta a la consenso, en los que se conservó o no, el extremo pG-OH situado a 3' del sitio de corte: "oligo 15-G" (5'-p*TCTGCAATCGTCGTG_{OH}-3') y "oligo 15-T" (5'-p*TCTGCAATCGTCGTT_{OH}-3'). Las reacciones se realizaron con una cantidad doble

de oligos y proteína, respecto al apartado anterior, ya que el marcaje en 5' fue muy poco eficiente. En cualquier caso, se pudo comprobar así que RepB también es específica de secuencia en su actividad de cierre (resultado no mostrado).

e) 1.26 pmol de los oligos 8-mer y 26-mer marcados en sus extremos 5', se trataron con dos concentraciones de RepB (1.2 y 2.3 pmol). Las mezclas se incubaron a 37, 45 y 60°C y se trataron como en los ensayos anteriores. Si la proteína fuese capaz de unir el oligo 8-mer (mitad derecha del sitio de corte) con la mitad izquierda (12-mer) del oligo 26-mer generada tras el corte por RepB, se detectaría una nueva banda de 20-mer. No obstante, se se puede observar (Fig 51C) que sólo se originó la banda de 12-mer (producto del corte del oligo 26-mer).

Los resultados obtenidos en estos ensayos nos permiten concluir: i) RepB sólo presenta actividad de cierre cuando el 5'-fosfato necesario para el cierre ha sido previamente generado por la proteína, y ii) esta reacción sólo se produce si el extremo 3'-OH conserva la secuencia 5'-TACTACG_{OH}-3' reconocida por RepB. Pensamos que la reacción de corte mediada por RepB libera un 5'-fosfato "activado" situado a 3' del sitio de corte (ver Discusión).

17. LA UNIÓN DE RepB A DNA NO PARECE ESTAR MEDIADA POR INTERMEDIARIOS COVALENTES ESTABLES

Una vez establecidos los parámetros necesarios para imitar *in vitro* las reacciones de iniciación de la replicación de pMV158, consideramos importante para este trabajo el analizar la naturaleza del enlace existente entre la proteína RepB y su DNA sustrato. Las dos únicas proteínas Rep de plásmidos que replican por el mecanismo de replicación RC, caracterizadas hasta la fecha, RepC (pT181) y RepD (pC221), generan intermediarios covalentes proteína-DNA. El mismo tipo de enlace se ha descrito para la proteína GpA del fago ϕ X174, y para varias proteínas Tra. Con el fin de determinar la posible unión covalente de la proteína RepB al DNA, se realizaron varios ensayos para aislar ese tipo de intermediarios, que se generarían durante la reacción de corte.

17.1. Precipitación de complejos proteína-DNA

Este ensayo se basó en la precipitación de complejos SDS-proteína y SDS-proteína-DNA (o RNA; si la unión proteína-ácido nucleico es covalente) mediada por iones K^+ (Waters *et al*; 1991). Para realizar este ensayo se incubó DNA de pLS1 (1 μ g) con RepB (86 ng), en tampón B y 20 mM $MnCl_2$. Se prepararon tres muestras que se incubaron durante 30 min a 37, 45 y 60°C, respectivamente. Como control se usó una muestra no tratada con RepB que se incubó durante el mismo tiempo a 45°C (por elegir una temperatura de actividad intermedia). En cada caso, la reacción se paró por adición de 1% SDS y 10 mM EDTA, incubándose 10 min a t.a. Después se ajustó la concentración de KCl hasta una molaridad final de 100 mM y se realizó una incubación de 20 min a 0°C. Las muestras se centrifugaron, recogiendo tanto el precipitado como el sobrenadante. El precipitado se disolvió en el mismo volumen de los sobrenadantes (30 μ l) con TE (10:1), se separó una alícuota de 4 μ l y se trató con 1 μ g/ μ l de proteinasa K. A los productos de reacción se les añadió tampón de carga BXGE, ajustándose el pH de las muestras correspondientes a los sobrenadantes con Tris-base. Los productos se analizaron, inmediatamente, en un gel de agarosa (0.9% en TBE y 0.5 μ g/ml de EtBr). No se observó el aumento de formas FII esperado en el precipitado de las muestras, donde supuestamente se encontrarían los complejos K^+ -SDS-proteína-DNA (Fig 52A). Con una modificación a este método, que consistía en parar las reacciones con 1.5% SDS y 10 mM EDTA y una incubación de 10 min a 75°C, obtuvimos un resultado similar. Sin embargo, se eliminó el calentamiento de las muestras porque se observó la aparición de formas desnaturalizadas del DNA.

17.2. Captura de complejos proteína-DNA

Uno de los ensayos se basó en la captura de complejos covalentes proteína-DNA en la interfase agua-fenol y su detección como bandas retardadas en un gel tras la digestión con un enzima de restricción adecuado (Pansagrau *et al*, 1990). Para ello, se incubó DNA de pMV158 (700 ng) con RepB (45 ng), tampón B y 20 mM $MnCl_2$ (volumen final, 30 μ l), durante 30 min a 60°C. La reacción se paró con SDS al 2.5%, incubándose 5 min a 37°C. Se añadió tampón TE (10:1) hasta un volumen final de 100 μ l y se realizó una fenolización con un volumen de una mezcla fenol:cloroformo (1:1). Se separaron la fase superior (fase acuosa) y la interfase. La fase superior se llevó a un volumen de 210 μ l con TE (10:1) y se precipitó con etanol. La interfase se llevó a un volumen final de 300 μ l con TE (10:1), se dializó frente a 300 ml de una solución

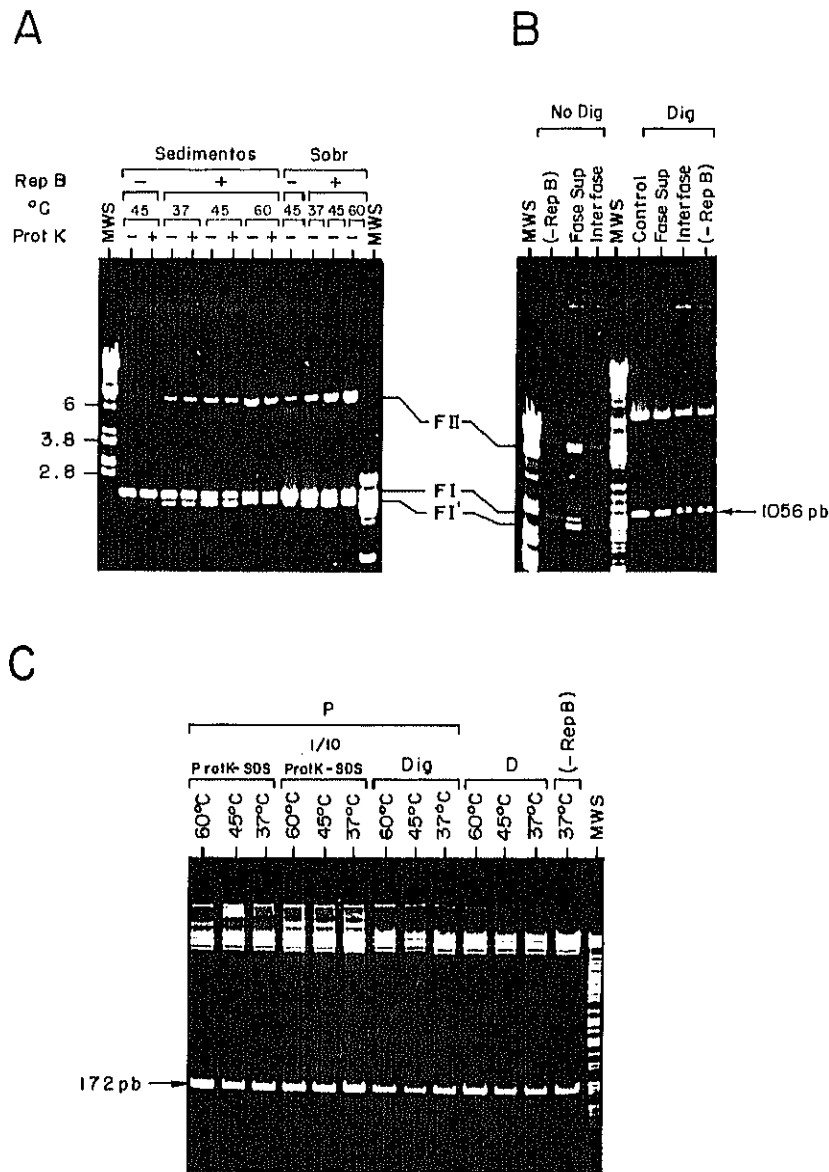


Figura 52. RepB no parece generar intermediarios covalentes estables tras su actividad de corte sobre DNA superenrollado. **A.** DNA de pLS1 tratado con RepB se incubó con SDS (1%) y 10 mM EDTA, 10 min a t.a. y se precipitó con 100 mM KCl, durante 20 min a 0°C. Los precipitados fueron tratados(+) o no(-) con proteinasa K (1 µg/µl). Se incluyó un control sin proteína que fue incubado a 45°C. **B.** DNA de pMV158 se incubó con RepB durante 30 min a 60°C, se trató con 2.5% SDS durante 5 min a 37°C y se fenolizó. Se separaron la fase acuosa y la interfase, y se digirieron con *Pst*I. Con una flecha se indica la posición del fragmento *Pst*I B de 1056 pb, que contiene el *dso* entero del plásmido. **C.** DNA de pLS5 se incubó con RepB a 37, 45 y 60°C; una cuarta parte de las muestras se dializó frente al tampón de *Fnu*4HI (**D**) y el resto se precipitó con etanol (**P**). Las muestras precipitadas se separaron en tres grupos: el primer grupo se digirió directamente con *Fnu*4HI; el segundo grupo se trató con proteinasa K (12.5 µg/ml) y 0.28% SDS, durante 10 min a t.a., se fenolizó y precipitó antes de la digestión con *Fnu*4HI; por último, el tercer grupo se trató con proteinasa K (125 µg/ml) y 0.28% SDS durante 30 min a 0°C, se fenolizó, precipitó y digirió con *Fnu*4HI. MWS: marcador de peso molecular.

con 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA y 250 mM KCl y se precipitó como en el caso anterior. El DNA precipitado se disolvió directamente en el tampón de digestión con *Pst*I y se digirió con esta enzima durante 2 h a 37°C. Las muestras se analizaron en un gel de agarosa (0.8% en TBE y 0.5 µg/ml de EtBr), ajustando las concentraciones de DNA de las muestras digeridas con *Pst*I, con respecto a las no digeridas. Antes de la digestión, se pudo observar que la cantidad de formas FII y FI' en la fase acuosa fue aproximadamente cinco veces superior a la encontrada en la interfase y en el control sin proteína (Fig. 52B). No se observó ningún retraso en la movilidad electroforética del fragmento de 1056 pb que contiene el *dso* de pMV158, como era de esperar si la proteína RepB se mantuviese unida covalentemente al DNA. Se realizaron algunas modificaciones a este método, como por ejemplo: parar la reacción con proteinasa K o digiriendo directamente las muestras tratadas con RepB, realizando diálisis de las interfases en filtro, análisis electroforético en presencia de 0.1% SDS o digiriendo con otras enzimas de restricción (como *Fnu*4HI) para obtener un fragmento más pequeño. En todos los casos, se obtuvo un resultado similar.

17.3. Retardo de fragmentos de restricción

En este caso se siguió el método descrito por Koepsel *et al* (1985), que consiste en tratar las muestras con la proteína en cuestión y parar la reacción con proteinasa K y SDS, digerirlas con el enzima adecuado y observar los intermediarios covalentes como bandas retardadas en el gel. Para este ensayo se incubó DNA de pLS5 (derivado de pLS1 que carece de la Horquilla III y del RNA I) (2 µg) con la proteína RepB (351 ng) en tampón B y 20 mM MnCl₂, durante 30 min a 37, 45 y 60°C. Se incluyó un control no tratado con RepB, que se incubó a 37°C en las mismas condiciones anteriores. Una cuarta parte de las muestras se dializó frente al tampón de digestión con *Fnu*4HI y el resto se precipitó directamente. Las muestras precipitadas se repartieron en tres grupos: el primer grupo se digirió directamente con *Fnu*4HI durante 2 h a 37°C; el segundo grupo se trató con 12.5 µg/ml de proteinasa K y 0.28% de SDS, durante 10 min a t.a., y luego fue sometido a extracción con fenol y precipitación con etanol, antes de llevar a cabo la digestión con *Fnu*4HI; y para el tercer grupo se siguió un tratamiento similar al del segundo, pero aumentando 10 veces la cantidad de proteinasa K (125 µg/ml) y realizando una

incubación de 30 min a 0°C, antes de la extracción con fenol. El volumen final de reacción se repartió en dos tubos y la mitad de las muestras se analizó en un gel 5% PAA en tampón TAE, en condiciones no desnaturalizantes. Tras la digestión con *Fnu*4HI se obtiene un fragmento de 172 pb que contiene la región *nic* del *dso* de la familia de pLS1, de modo que los intermediarios covalentes RepB-DNA darían lugar a un retardo de este fragmento. Tal retardo no se observó en las condiciones ensayadas (Fig. 52C). La otra mitad de las muestras se analizó en un gel de agarosa alcalino y, tras la electroforesis, el DNA se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se hibridó con DNA de pCGA7 marcado con [α -³²P]dCTP. Usando el plásmido pCGA7 como sonda sólo podrán hibridar aquellas bandas de DNA que contengan la región *nic* del origen de pLS1. No se observó ninguna banda que pudiese corresponder a un retraso electroforético de la banda de 172 pb (que contiene la región *nic* y tras el corte producido por RepB daría origen a dos fragmentos de 58 y 114 pb) (no mostrado). Se realizó otro ensayo usando DNA de pLS1, donde se incluyó una muestra en la que se suprimió la precipitación inicial con etanol. Tras la digestión con *Fnu*4HI se obtuvieron los mismos resultados: no se observó ningún retraso en la migración electroforética del fragmento que contenía la región *nic* del origen (en este caso se trataba de un fragmento de 505 pb que contenía el *dso* entero) (no mostrado).

17.4. Retardo de oligonucleótidos

Por último, se intentaron visualizar los complejos proteína-DNA covalentes a través de un ensayo basado en la migración electroforética retardada de complejos covalentes proteína-oligonucleótidos (Pansegrau *et al*, 1993). Como RepB es capaz de reconocer y actuar sobre oligos monocatenarios que contienen su sitio de corte, se diseñó un experimento para saber si, tras la actividad de RepB, se generan intermediarios covalentes RepB-DNA. Para ello, se marcó el "oligo wt" de 23-mer (5'-GGGGGGGCTACTACGACCCCCCCC-3') en su extremo 3'-terminal con la transferasa terminal y [α -³²P]ddATP. El "oligo wt" marcado (3.75 pmol) se incubó con tres concentraciones de RepB (5.5, 13.9 y 27.8 pmol; que corresponden a una relación DNA:proteína en moléculas de 1:1.5, 1:3.7 y 1:7.4, respectivamente) en tampón B y 20 mM MnCl₂, en un volumen de 90 μ l. Las muestras se prepararon por triplicado y se incubaron durante 30 min a 37, 45 y 60°C; los productos de reacción se trataron

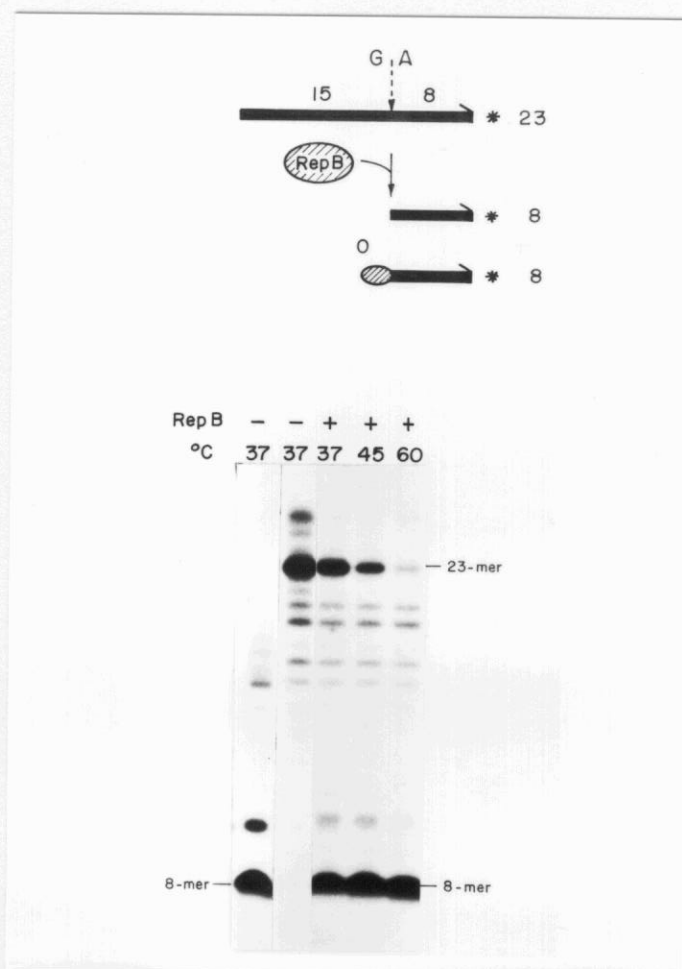


Figura 53. Interacción de RepB con un oligonucleótido marcado en su extremo 3'. El oligo "wt" [5'-GGGGGGGCTACTACG/ACCCCCC-3', donde (/) indica el sitio de corte de RepB; 3.75 pmol] marcado en su extremo 3', se incubó (+) o no (-) con RepB (13.9 pmol) a 37, 45 y 60°C. Los productos de reacción se trataron con proteinasa K y se analizaron en un gel de PAA al 20%/8 M urea. Como control de tamaño se utilizó una mezcla de un oligo 8-mer (5'-ACCCCCC-3') marcado en 3', fosforilado o no. Los productos de reacción con RepB migran a la altura del oligo 8-mer fosforilado. En la parte superior se muestra una representación del experimento realizado. Si se hubiese generado un intermediario covalente péptido-DNA, se observaría una banda retardada respecto a la posición del oligo 8-mer fosforilado libre de proteína.

con 215 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinasa K durante 20 min a 37°C, con el fin de dejar sólo un pequeño péptido unido al DNA, en el caso de que se generase un complejo covalente RepB-DNA. Las muestras se llevaron a un volumen final de 120 μl y se precipitaron con etanol. El precipitado se disolvió directamente en el tampón de carga BXF y los

productos se analizaron en un gel 20% PAA/8 M urea. Como control de tamaño se utilizó el oligonucleótido 5'-ACCCCCC-3' (8-mer) fosforilado o no en 5' y marcado en su extremo 3'. Tras la exposición autorradiográfica del gel, sólo se detectaron las bandas correspondientes a los oligos de 8-mer (fosforilado o no) y 23-mer. Los resultados mostraron que las bandas originadas tras la actividad de RepB migraron a la altura del oligo de 8-mer fosforilado (Fig. 53). Estos serían los productos esperados si no hubiese una unión covalente péptido-DNA.

17.5 Unión proteína-DNA en filtros

Como todos los ensayos realizados hasta el momento para detectar intermediarios covalentes RepB-DNA resultaron negativos, se realizaron ensayos de unión en filtro (de la Campa *et al.*, 1990) con el fin de conocer la naturaleza y estabilidad de los complejos proteína-DNA generados por RepB. En estos ensayos se incubaron 3.75 pmol del "oligo wt" marcado en su extremo 3' con 5.6 pmol de RepB (relación DNA:proteína en moléculas de 1:1.5) durante 5 min a 60°C, en tampón B y 20 mM MnCl₂, en un volumen final de 90 µl. La reacción se paró en hielo con 900 µl del tampón L frío (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 20 mM KCl, 5 mM DTT) suplementado con 50 mM EDTA. Los productos de reacción se pasaron a través de filtros de nitrocelulosa de 0.45 µm, previamente lavados con el tampón L y con un exceso de un oligonucleótido inespecífico (así se consiguió reducir el nivel de unión inespecífica de ssDNA al filtro). A continuación, se realizaron lavados con el tampón L suplementado con distintas concentraciones de KCl (0.02 a 1 M), de NaCl (0.02 a 1.5 M) y de SDS (0.5 a 1.5%), o bien con tampones preparados a distintos pH (7.0 a 9.5). Se calculó el porcentaje de radiactividad retenida en los filtros (Fig. 54A), tomando con valor 100 las cpm retenidas en el filtro lavado con el tampón L preparado en condiciones normales (pH 8.0 y 0.02 M KCl). Se pudo observar que los complejos RepB-DNA son muy sensibles a la concentración de SDS, lo cual indicaría la existencia de complejos no covalentes. Asimismo, se observó cierta sensibilidad frente a concentraciones altas de sal, lo que indica la existencia de interacciones electrostáticas entre la proteína y el DNA. Variaciones del pH en el tampón de lavado, por encima del punto isoeléctrico de RepB (valor determinado en 8.8; Fig. 54B) también redujeron la cantidad de DNA unido a RepB. Dado que a valores de pH superiores a su punto isoeléctrico, la proteína presenta carga negativa, este ensayo

A

Tampón de lavado		ssDNA retenido ^a
		%
KCl (mM)	20	100
	500	98
	1000	60
NaCl (mM)	20	100
	500	50
	1000	45
	1500	55
SDS (%)	0	100
	0.5	10
	1.0	0
	1.5	0
pH	7.0	113
	8.0	100
	8.5	80
	8.8	65
	9.0	55
	9.5	40

^a El valor 100% se obtiene en las condiciones de ensayo normales (tampón I, sin suplementos y preparado a pH 8.0) y corresponde a un valor de 400 (± 50) cpm/muestra.

B

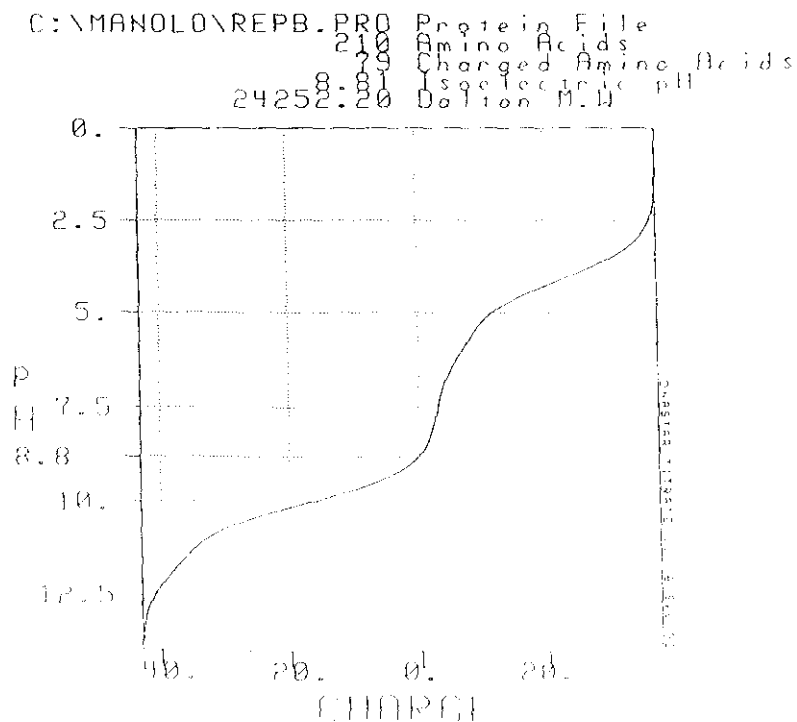


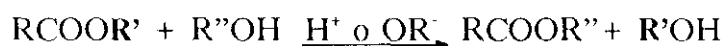
Figura 54. A. Ensayos de unión proteína-DNA en filtro: efectos de las distintas condiciones de lavado sobre la unión de RepB a oligonucleótidos. **B.** Representación gráfica de la carga de la proteína RepB a los distintos pH. Determinación del punto isoeléctrico de RepB a pH 8.8.

sugiere que los aa cargados positivamente son importantes en el tipo de interacción que se produce entre RepB y el DNA.

Los resultados de este Apartado sugieren fuertemente que la unión de RepB al DNA se produce a través de un enlace fosfodiéster transitorio, como sucede con la proteína gpII del fago fd (Meyer y Geider, 1979) o bien a través de una unión no-covalente, en la que son importantes las interacciones electrostáticas y los aa cargados positivamente.

18. ANÁLISIS DE LA QUIRALIDAD DEL FOSFATO QUE INTERVIENE EN LA UNIÓN DE LA PROTEÍNA RepB AL dso DE pLS1.

Hasta el momento, todos los ensayos realizados para capturar algún intermediario covalente RepB-DNA resultaron negativos, lo que nos hacía suponer que la proteína se unía a su diana a través de una unión no-covalente o mediante un enlace covalente transitorio que impedía capturar los intermediarios proteína-DNA de la reacción mediante los métodos convencionales. Esta cuestión no es trivial, dado que: i) las proteínas Rep de pT181 y de pC221 (las únicas otras dos proteínas Rep de plásmidos con replicación RC purificadas) se unen covalentemente a DNA, y ii) esta unión covalente justifica una característica esencial de las proteínas Rep de los plásmidos y es que, a diferencia de lo que ocurre en colifagos, no deben ser reutilizadas para evitar sobre-replicaciones (Rasooly y Novick, 1993). Por todo ello, surgió la idea de estudiar la quiralidad de fosfato que interviene en la unión de la proteína RepB al *dso* de pLS1. La reacción de corte del DNA mediada por RepB, que no requiere cofactores de alta energía, se basa en un mecanismo de transesterificación del tipo (cambio del grupo O-alkilo):



Si la reacción de transferencia de hebra ocurre vía un intermediario covalente proteína-DNA (como ocurre para la proteína Int del fago λ y para las DNA topoisomerasas), la energía de enlace se conserva durante la transferencia y se

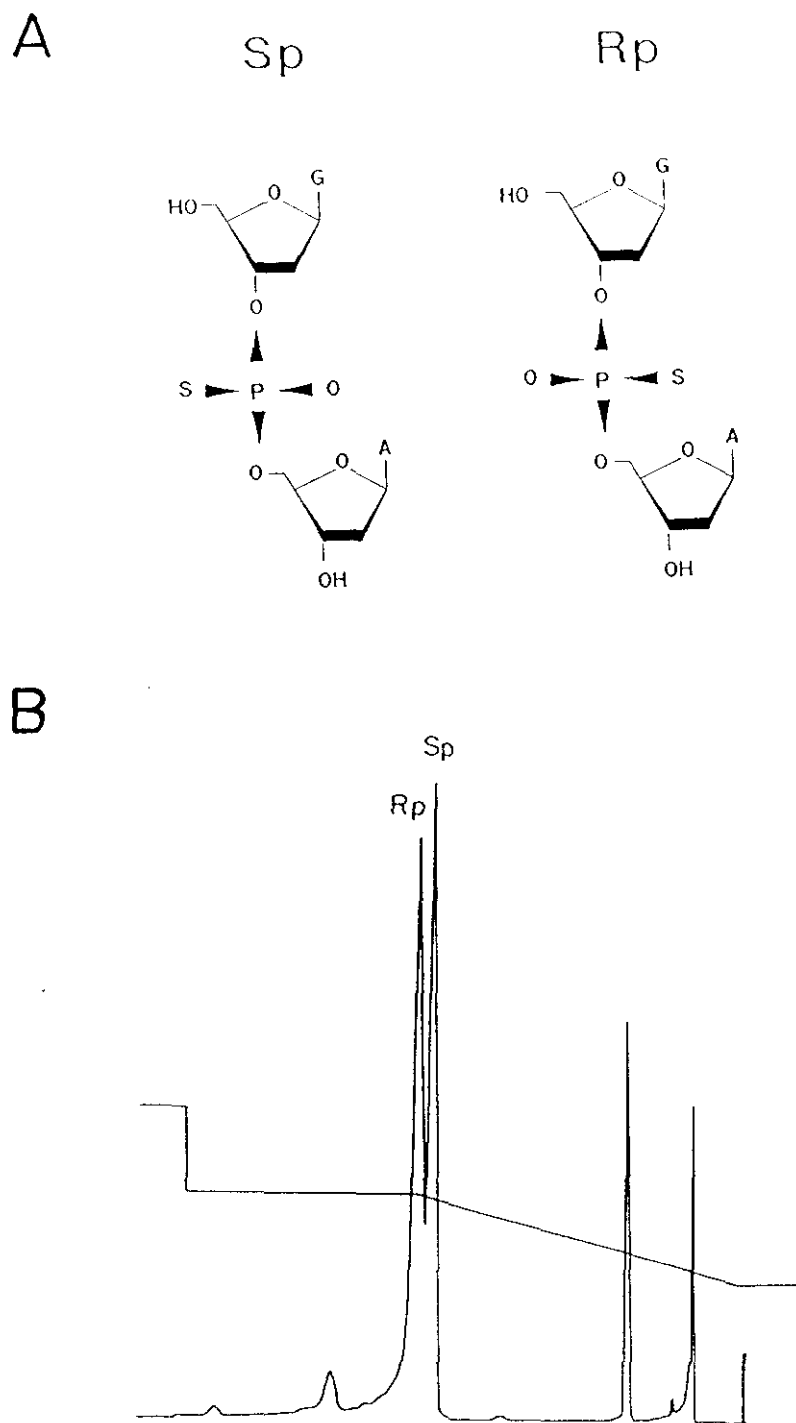


Figura 55. A. Representación gráfica de la configuración absoluta (R_p y S_p) de los diastereoisómeros de $d(Gp^S A)$. B. Gráfica que representa la separación mediante cromatografía por HPLC, de los diastereoisómeros R_p y S_p .

requieren como mínimo 2 pasos de transesterificación (con 2 pasos de rotura de enlace y 2 pasos de unión). En cambio, si la reacción no implica un intermediario covalente proteína-DNA, la reacción de transposición se producirá a través de un único paso de transesterificación (como ocurre con la transposición del fago Mu; Mizuuchi y Adzuma, 1991). En este caso, los átomos de oxígeno en 3' del DNA donador pre-expuesto a la transposasa, pueden ser usados directamente para el ataque nucleofílico del fosfato del DNA diana y se produce el corte y la unión simultáneamente. Para conocer si la transferencia de DNA ocurre en 1 ó 2 pasos de transesterificación, se debe estudiar la estereoquímica del fosfato implicado en la reacción. Para ello, se requiere que este fosfato sea quiral, lo cual se consigue substituyendo uno de los oxígenos que no forman parte del enlace fosfodiéster, con un átomo de azufre (derivado fosforotioato). Los dos diastereoisómeros (configuraciones R_p y S_p ; Eckstein, 1985; Fig. 55A) se pueden separar por cromatografía en HPLC, en dos picos de distinta migración: el pico de migración más rápido contiene la forma S_p , mientras que el más lento corresponde al diastereoisómero R_p (Mizuuchi y Adzuma, 1991; Fig. 55B). Una vez separados los dos diastereoisómeros, la configuración R_p o S_p se puede distinguir por digestión con las nucleasas P1 (que deja 5'-P y digiere preferentemente enlaces R_p -fosforotio) y PDE (que deja 5'-P y digiere enlaces S_p -fosforotio). Como en cada paso de transesterificación se invierte la quiralidad del fosfato, si la reacción se produce con 2 (o un número par) pasos de transesterificación (a través de un intermediario covalente) se mantiene la configuración R_p o S_p del fosfato quiral. Si, por el contrario, la reacción ocurre en un único paso de transesterificación (a través de una unión no covalente), la quiralidad del fosfato se invierte (Mizuuchi y Adzuma, 1991; Hanai y Wang, 1993).

El experimento que se diseñó inicialmente (Fig. 56) se basaba en la construcción de un oligonucleótido con la secuencia de corte de la proteína RepB y que llevase un fosfato quiral en la posición del fosfato implicado en la unión proteína-DNA (5'-TpGpGpGpGpGpGpGpCpTpApCpTpApCp*Gp^SApCpCpCpCpCpCpCpA_n-3'; donde **p*** indica un fosfato marcado radiactivamente con [γ -³²P]dATP y **p^S**, representa el fosfato quiral situado entre los nt G/A donde se produce el corte). La síntesis química del oligonucleótido de 9-mer Gp^SApCpCpCpCpCpCpCpCpOH-3' y la separación de los dos tio-derivados (configuración R_p y S_p) se llevó a cabo en el laboratorio del Dr.

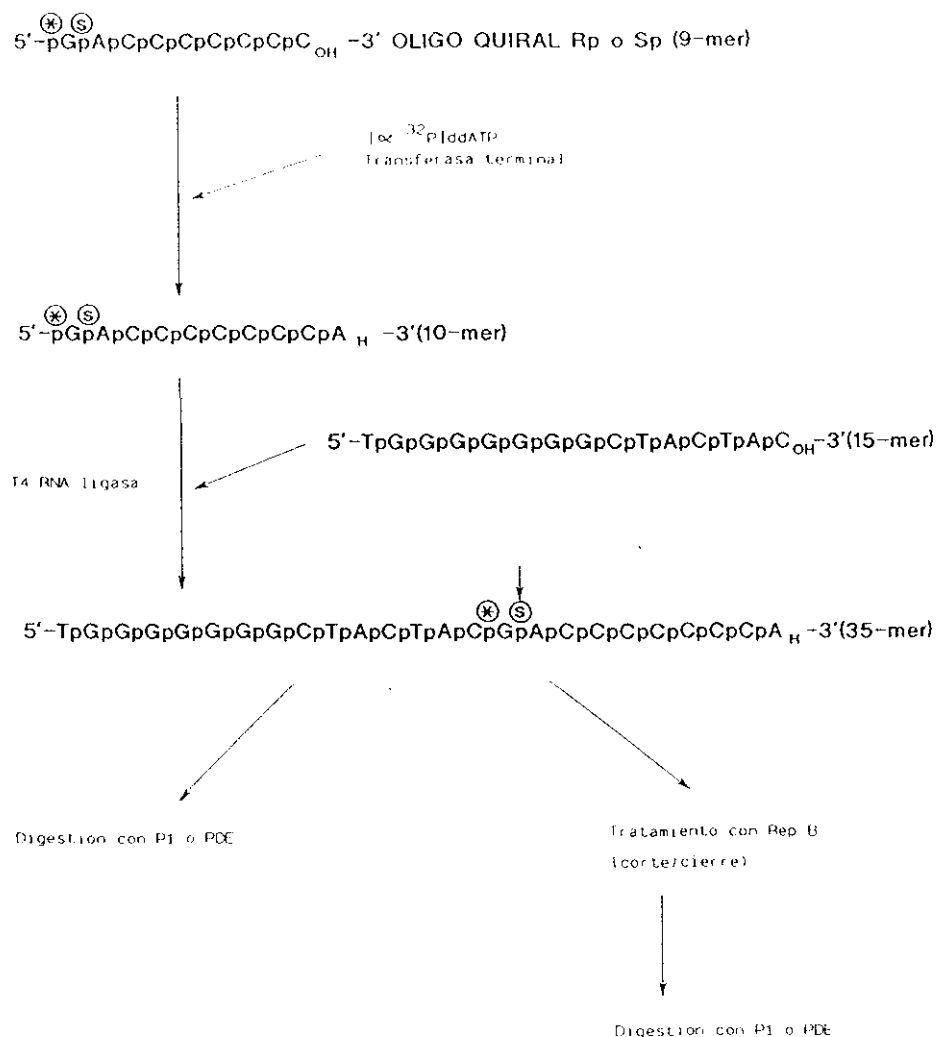


Figura 56. Diagrama explicativo para la construcción del oligo sustrato ($5'-\text{TpGpGpGpGpGpGpGpGpCpTpApCpTpApCp}^{\text{S}}\text{GpApCpCpCpCpCpCpCpCpA}_{\text{H}}-3'$) mediante la ligación de los oligos quirales (9-mer; $5'-\text{Gp}^{\text{S}}\text{ApCpCpCpCpCpCpCpC}_{\text{OH}}-3'$), con el grupo -OH en 3' bloqueado con ddATP, y el oligo 15-mer ($5'-\text{TpGpGpGpGpGpGpGpGpCpTpApCpTpApC}_{\text{OH}}-3'$) con la T4 RNA ligasa. Se indica la secuencia y tamaño de los oligos de partida y de los oligos producto, así como la posición del fosfato quiral (p^{S}) o marcado radiactivamente ($p^{\text{*}}$).

Ramón Eritja. Hay que señalar que para poder separar los dos diastereoisómeros, la síntesis del oligo se debe parar tras la adición del nt con el fosfato quiral. Se comprobó la configuración de los dos diastereoisómeros (R_p o S_p) mediante digestión con las nucleasas P1 o PDE. Ambos tio-derivados se marcaron en sus extremos 5' con la T4 PNK y $[\alpha-^{32}\text{P}]\text{dATP}$ y se les bloqueó el grupo -OH en 3' usando ddATP y la

transferasa terminal. Como resultado se obtuvo el oligonucleótido 5'-p*Gp^sApCpCpCpCpCpCpA_H-3', con cada uno de los tioderivados. Por otro lado, se sintetizó el oligo de 15-mer: 5'-TpGpGpGpGpGpGpGpCpTpApCpTpApC_{OH}-3' y se realizó una ligación de ambos oligonucleótidos usando la T4 RNA ligasa (Brennan *et al*, 1983). Para realizar la ligación se preparó una mezcla con 300 pmol de oligo tioderivado marcado en su extremo 5' (donador-P, 30 μ M de concentración final), 1.2 nmol del oligonucleótido 15-mer (aceptor-OH, 120 μ M de concentración final), 0.15 nmol de ATP (15 μ M), 1 mM fosfocreatina pH 9.0 y 2 mM espermina pH 7.9. Esta mezcla se llevó a sequedad en una bomba de vacío y luego se añadió el resto de los componentes: 50 mM HEPES-NaOH pH, 7.9, 10 μ g/ml BSA, 20 mM DTT, 175 u/ml de creatina-fosfato-quinasa, 170 u/ml de adenilatoquinasa, 10 mM MnCl₂ y 50 u de T4 RNA ligasa, en un volumen final de 10 μ l. La reacción se incubó a 8°C durante 5 días y cada día se tomaron alícuotas de 2 μ l. Las muestras se analizaron en un gel 24% PAA/8.3 M (50%) urea. No se observó una banda de 24-mer (que sería el resultado de la ligación del tio-derivado de 9-mer y del oligo 15-mer), sino que todas las muestras (incluido el control) presentaban numerosas bandas, que se atribuyen a estructuras complejas adoptadas entre ambos oligos debido al alto porcentaje de G y C que contienen (resultados no mostrados).

Debido a las bajas eficiencias de ligación, se diseñó un segundo experimento (Fig. 57), usando en este caso la secuencia del plásmido pFX2 (con un sitio de corte para RepB idéntico al de pLS1) para sintetizar los oligonucleótidos quirales de 9-mer (5'-Gp^sApCpCpCpCpCpA_{OH}-3') y no quirales. Estos últimos se denominaron: pFX₁ de 14-mer (5'-TpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpApC_{OH}-3'), pFX₂ de 9-mer (5'-GpApCpCpCpCpA_{OH}-3') y pFX₃ de 24-mer (5'-ApApGpCpGpApApTpTpTpTpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpApC_{OH}-3'). La construcción del oligonucleótido sustrato de RepB (23-mer), producto de la unión de los oligos tio-derivados fosforilados (30 pmol) y del oligo pFX₁ (15 pmol) se realizó con T4 DNA ligasa y DNA desnaturizado de pFX2 como molde (15 pmol). La reacción se realizó con exceso de los oligos tio-derivados para aumentar la probabilidad de que el oligo pFX₁ se hibridase a moléculas de pFX2 que tuviesen ya anillado el oligo quiral. Para comprobar el éxito de la ligación, se marcó una alícuota (~ 1 pmol) con T4 PNK, [γ -³²P]dATP y 50% DMSO, y se analizó en un gel 20% PAA/8 M urea (Fig. 58). Por otro lado, se anilló el oligo pFX₃ (15

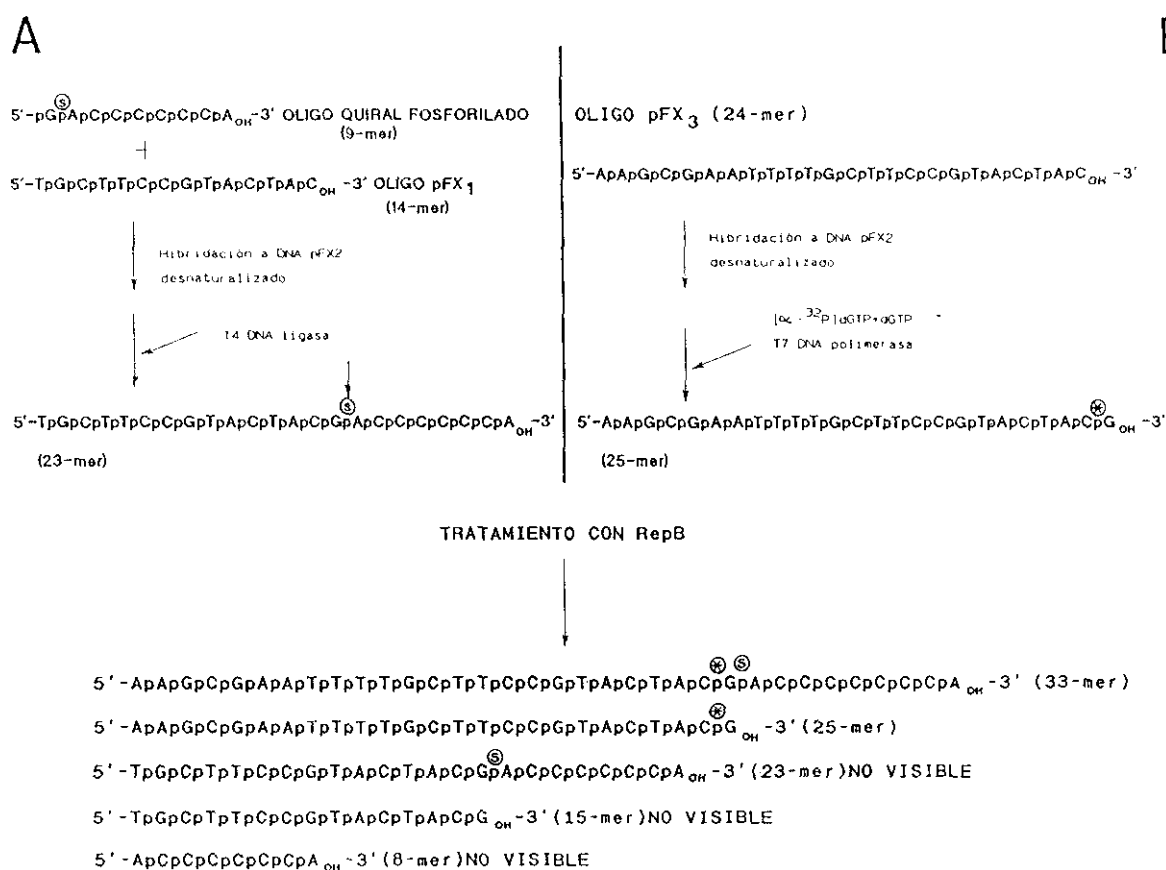


Figura 57. Diagrama del experimento realizado para obtener el oligo sustrato, resultado de la ligación de los oligos quirales (9-mer; 5'-Gp⁵ApCpCpCpCpCpA_{OH}-3') al oligo pFX₁ de 14-mer (5'-TpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpApC_{OH}-3') y para la polimerización del oligo pFX₃ de 24-mer (5'-ApApGpCpGpApApTpTpTpTpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpApC_{OH}-3') con [α -³²P]dGTP, mediante el anillamiento de los oligonucleótidos a DNA de pFX2. Se indica la secuencia y tamaño de los oligos de partida y de los oligos producto, así como la posición del fosfato quiral (p⁵) o marcado radiativamente (p^{*}).

pmol) con DNA desnaturalizado de pFX2 (15 pmol) y mediante la T7 DNA polimerasa se incorporó [α -³²P]dGTP (o dGTP) en su extremo 3', obteniéndose como resultado un oligo de 25-mer con el nt G del sitio de corte marcado radiativamente (pFX₃-G^{*}). En este caso, se comprobó la eficiencia de polimerización tomando una alícuota de 0.5 μ l y calculando el porcentaje de cpm incorporadas frente al valor de cpm total (ver Materiales y Métodos). El porcentaje de moléculas polimerizadas (que

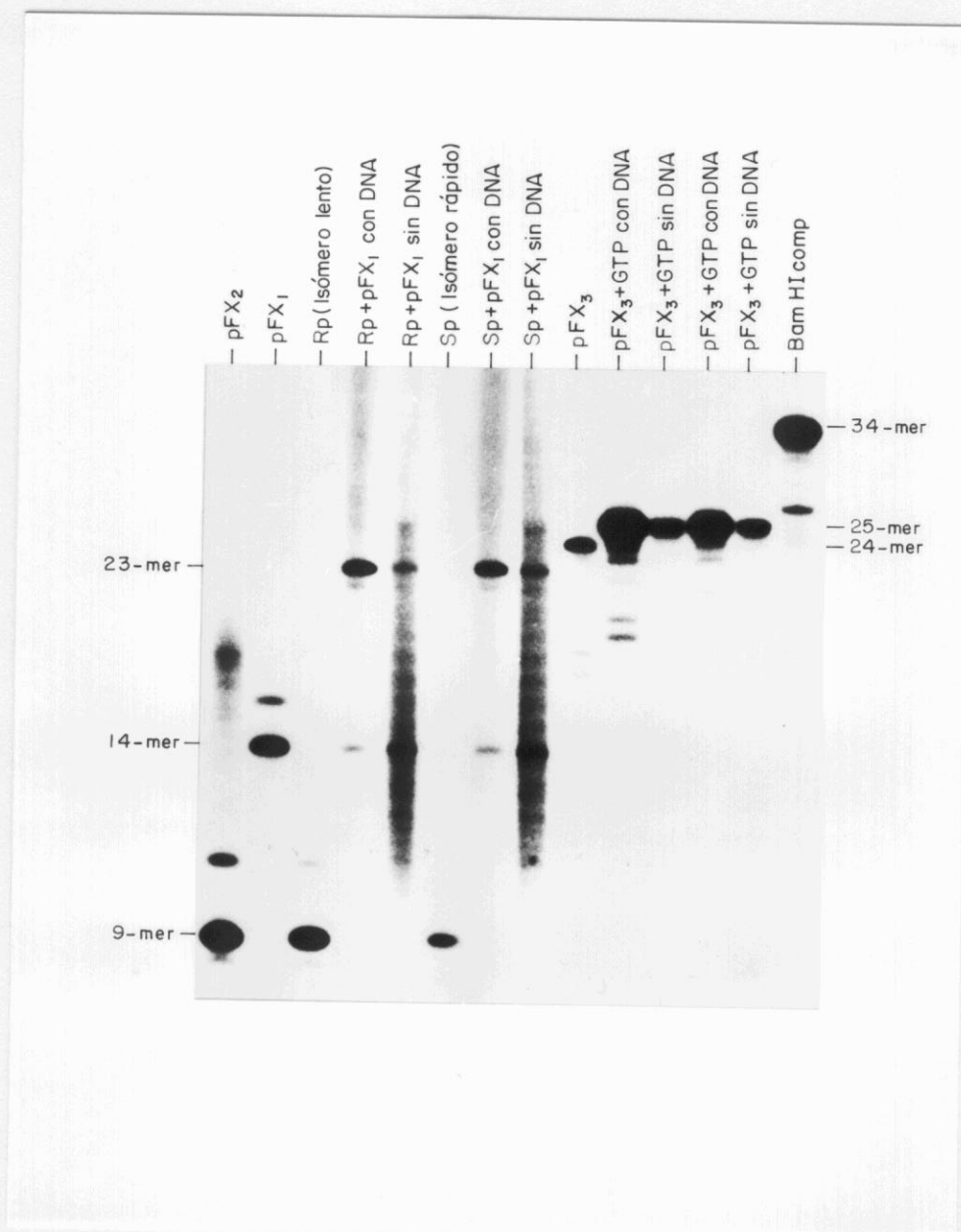


Figura 58. Análisis de los productos de la reacción de ligación de los oligos quirales (9-mer; 5'-Gp^sApCpCpCpCpCpCpA_{OH}-3') fosforilados y del oligo pFX₁ (14-mer; 5'-TpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpApC_{OH}-3') y de la reacción de polimerización del oligonucleótido pFX₃ (24-mer; 5'-ApApGpCpGpApApTpTpTpTpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpApC_{OH}-3') y [α-³²P]dGTP con la T7 DNA polimerasa, antes y después de la purificación usando los microconcentradores Microcon 100 y Microcon 3.

habían incorporado dGTP) fue del 39%. Como existía la posibilidad de que la T7 DNA polimerasa hubiese incorporado varios dGTP al extremo 3' del oligo, se realizó una extracción con fenol y una precipitación con etanol, para analizar otra alícuota en un gel 20% PAA/8 M urea y comprobar así que se había incorporado un sólo

dGTP al oligo de 24-mer (pFX₃), obteniéndose por tanto, una banda de 25-mer mayoritariamente (Fig. 58). La eliminación del DNA molde de pFX₂ se llevó a cabo pasando las muestras, previamente diluidas y desnaturalizadas por calor, por un microconcentrador Microcon 100, donde los oligos o nt no incorporados se recuperaban en el filtrado. Este filtrado se pasó igualmente por el Microcon 3, para la eliminación del nt no incorporado y del oligo quiral (9-mer) no anillado. Lamentablemente, se comprobó que los oligos de 23-mer (resultado de la ligación de los tio-derivados y del pFX₁) y de 25-mer (pFX₃-G*) no eran retenidos en la membrana y también pasaban al filtrado. Por ello, en repeticiones de este experimento, se eliminó la centrifugación usando el Microcón 3 y se secó el filtrado del Microcon 100 en una "Speed-Vac", evaporando el agua a vacío. De todas formas, las pérdidas de las moléculas sustrato obtenidas superaron el 85%.

Una vez obtenidos los oligonucleótidos sustrato: oligo 23-mer (producto de la ligación de los tio-derivados y de pFX₁) y oligo de 25-mer (pFX₃-G*), se realizó una incubación con RepB, en condiciones de corte/cierre para permitir el intercambio y unión del oligo pFX₃-G* con la mitad quiral del oligo sustrato de 23-mer, obteniéndose entonces, un oligo de 33-mer marcado con un fosfato interno (5'-ApApGpCpGpApApTpTpTpTpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpApCp*Gp^sApCpCpCpCpCpA_{OH}-3'). Para ello, se incubaron aproximadamente 0.62 pmol del oligo pFX₃-G* y del oligo pFX₃-G (polimerización realizada con dGTP no radiactivo) con el oligo quiral sustrato de 23-mer y dos concentraciones distintas de RepB (0.6 y 1.9 pmol), durante 20 min a 45°C. Las muestras se trataron con proteinasa K (125 µg/ml) y se precipitaron con etanol. Se analizó una alícuota de cada muestra en un gel 20% PAA/8 M urea y se pudo observar la aparición de una banda tenue de unos 33-mer, producto de la unión del oligo pFX₃-G* de 25-mer con la mitad de 8-mer, producto del corte del oligo de 23-mer quiral (Fig. 59B). Como control de actividad se realizó un ensayo paralelo con el oligo 26-mer marcado (5'-p*GGGGCTACTACG/ACCC CCCCTATAGT-3'; 0.62 pmol) y una mezcla del oligonucleótido 15-mer (5'-GGGGGGGGCTACTACG-3') marcado en 5' (0.62 pmol) o no (0.62 pmol), con tres concentraciones de la proteína RepB (0.37, 0.75 y 1.5 pmol), y una incubación de 20 min a 45°C. Las muestras también se analizaron en un gel 20% PAA/8 M urea,

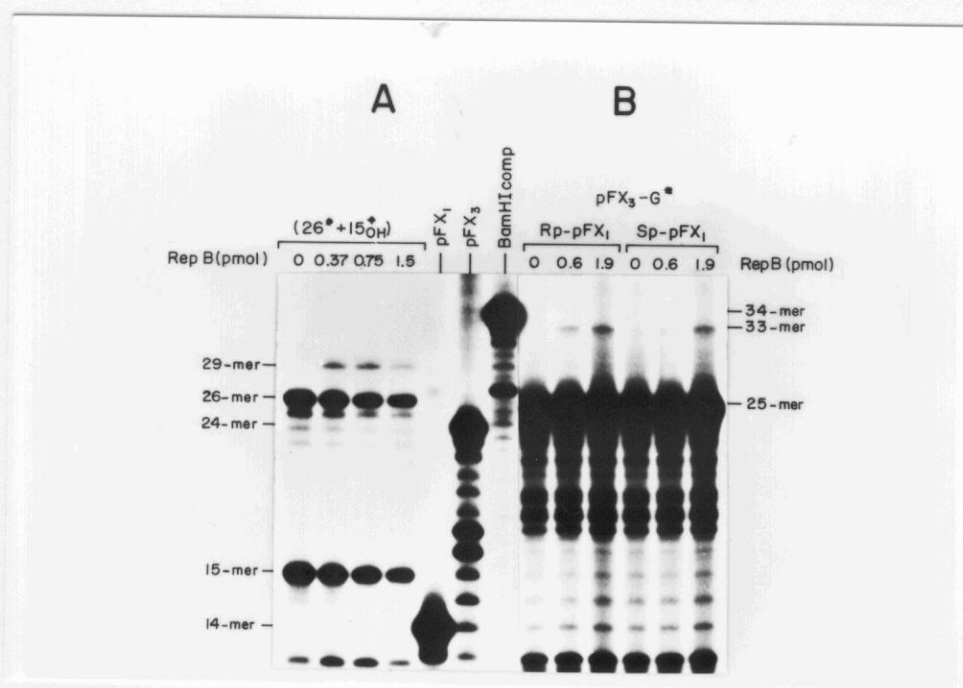


Figura 59. Actividad nucleotidil-transferasa de RepB sobre oligonucleótidos quirales. A. El oligo 26-mer marcado (5'-GGGGCTACTACG/ACCCCCCTATAGT-3'; 0.62 pmol) y una mezcla del oligo 15-mer (5'-GGGGGGGCTACTACG-3'; 0.62 pmol) marcado o fosforilado, se incubaron con tres concentraciones de RepB (0.37, 0.75 y 1.5 pmol), durante 20 min a 45°C. Los productos de reacción se analizaron en un gel 20% PAA/8 M urea. B. Una mezcla del oligo pFX₃-G* (25-mer: 5'-ApApGpCpGpApApTpTpTpTpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpApCp*G_{OH}-3'; ~0.62 pmol) y oligo pFX₃-G (~0.62 pmol; polimerización realizada con dGTP no radiactivo) se incubó con el oligo quiral sustrato de 23-mer (5'-TpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpApCpGp^SApCpCpCpCpCpA_{OH}-3') y dos concentraciones de RepB (0.6 y 1.9 pmol), durante 20 min a 45°C. Se analizó una alícuota de cada muestra en un gel 20% PAA/8 M urea y se pudo observar la aparición de una banda tenue de aproximadamente 33-mer (producto de la unión del oligo pFX₃-G* de 25-mer con la mitad de 8-mer, producto del corte del oligo de 23-mer quiral).

observándose una banda de 29-mer, producto de la unión del oligo de 15-mer a la mitad derecha (14-mer) del oligo de 26-mer cortado (Fig. 59A).

La banda de 33-mer, producto de la transferencia del oligo pFX₃-G* (25-mer) a la parte derecha (8-mer) del oligo quiral sustrato de 23-mer, se purificó de un gel 20% PAA/8 M urea. A continuación, se analizó la quiralidad del fosfato mediante digestión con dos nucleasas estereoespecíficas: nucleasa P1 y PDE. Si el sustrato inicial tuviese la configuración R_p (por ejemplo) y el mecanismo de corte/cierre de RepB ocurre a través de un intermediario covalente, se mantendría la quiralidad del fosfato (R_p) y por tanto, al tratar el oligo de 33-mer con la nucleasa P1 reconocería

el enlace R_p -fosforotio y se obtendría como resultado el mononucleótido p^*G . Por su parte, PDE no reconocería este tipo de enlace (ya que actúa preferentemente sobre el enlace S_p -fosforotio) y se obtendría el dinucleótido p^*Gp^5A . Si, por el contrario, no existe intermediario covalente, habría una inversión de la quiralidad del fosfato, pasaría de R_p a S_p . En este caso, el enlace S_p -fosforotio no sería sustrato de la nucleasa P1 y se obtendría el dinucleótido marcado, mientras que PDE sí podría actuar sobre este tipo de enlace, dando como resultado el mononucleótido. La incubación con la nucleasa P1 (0.0015 u) se realizó a 37°C y con PDE (0.15 u) a t.a. (28°C). En ambos casos, se tomaron alícuotas (7.5 μ l) a los 5 y 60 min de incubación, se les añadió colorante de carga y se evaporaron a vacío hasta un volumen final de 7.5 μ l. Como controles se utilizaron los oligos quirales 9-mer R_p (0.3 pmol) y S_p (0.5 pmol) y se digirieron con las nucleasas P1 (0.0027 u) y PDE (0.27 u), incubando 90 min a 37°C y t.a., respectivamente (Fig. 60A). Como controles de tamaño se utilizaron

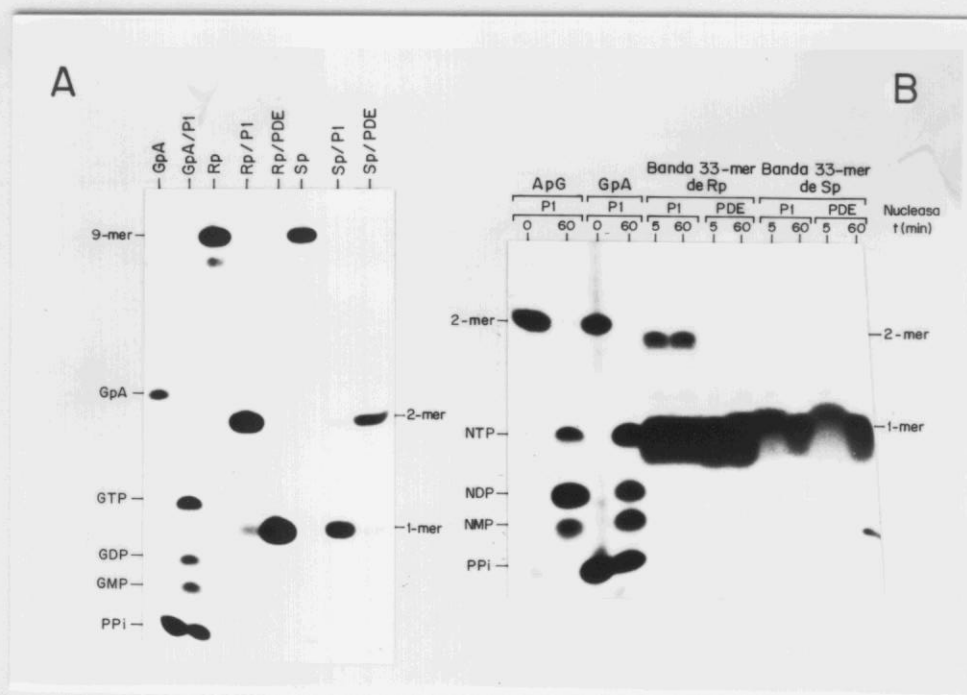


Figura 60. Análisis de la quiralidad del fosfato implicado en la unión de RepB a DNA. Las bandas de 33-mer, productos de la actividad de corte/cierre de RepB sobre los oligos quirales sustrato de 23-mer (5'-TpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpApCpGp^SApCpCpCpCpCpA_{OH}-3') y el oligo pFX₃-G* (25-mer; 5'-ApApGpCpGpApApTpTpTpTpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpApCp*G_{OH}-3') se purificaron de PAA y se digirieron con dos nucleasas estereoespecíficas: nucleasa P1 y PDE. Como controles se incluyen los oligos quirales de 9-mer (5'-Gp^SApCpCpCpCpCpA_{OH}-3') digeridos o no con las nucleasas indicadas, los dinucleótidos GpA y ApG marcados en 5' y los mononucleótidos p^*G y p^*A (producto de la digestión de los dinucleótidos con la nucleasa P1). Los productos de reacción se analizaron en un gel 24% PAA/8.3 M urea.

los dinucleótidos GpA y ApG marcados en su extremo 5' y los mononucleótidos p*G y p*A, producto de la digestión de los dinucleótidos p*GpA y p*ApG con la nucleasa P1. Los productos de la digestión se analizaron en un gel 24% PAA/8.3 M (50%) urea. Pudimos observar (Fig 60B) que la digestión de la banda de 33-mer, procedente del isómero lento R_p , con la nucleasa P1 dio como resultado una banda de dinucleótido junto con el mononucleótido. La digestión con PDE sólo dio como resultado mononucleótido, lo cual estaría indicando que se mantiene la quiralidad inicial del fosfato y por tanto, la actividad de RepB transcurre a través de un enlace covalente. Por desgracia, con la banda de 33-mer procedente del isómero rápido S_p no se observa nada claro, debido a la poca radiactividad de la banda extraída de gel (<500 cpm) y al porcentaje de fondo radiactivo tan intenso observado en las muestras antes y después de la elución de las bandas. Esto también explicaría la presencia de una banda de mononucleótido más intensa que la de dinucleótido, en la muestra procedente de R_p digerida con nucleasa P1. Por tanto, concluimos, de forma tentativa, que la unión de RepB a DNA se produce a través de la formación de un intermediario covalente. Su formación y rotura se realizaría de forma muy rápida, lo cual explicaría porqué no se han podido capturar o detectar estos intermediarios, por los métodos más convencionales.

19. RepB RECONOCE LOS dso DE PLÁSMIDOS RELACIONADOS

En la Introducción a esta Tesis se mostró una relación de los miembros de la familia pLS1 descritos hasta la fecha (Tabla 1), pero en nuestro laboratorio sólo disponemos de los plásmidos pE194 (de *S.aureus*) y pFX2 (de *L.lactis*). No se ha podido establecer pE194 en *S.pneumoniae*, aunque sí se ha transferido a *B.subtilis*; por el contrario, sí se consiguió transferir pFX2 a *S.pneumoniae*. Los DNAs de ambos plásmidos fueron purificados mediante dos gradientes consecutivos de CsCl. Para saber si RepB reconoce las regiones *nic* de otros plásmidos de la familia, se realizaron ensayos de corte/cierre con 700 ng de DNA plasmídico y 45 ng de RepB, en un volumen final de 30 μ l. Las muestras se incubaron durante 30 min a 37, 45 y 60°C, y luego se trataron con proteinasa K (125 μ g/ml). Los resultados mostraron que RepB fue capaz de relajar DNA de pFX2, pero no presentó actividad de corte/cierre frente

al DNA de pE194 a ninguna de las temperaturas ensayadas (Fig 61). Estos resultados fueron sorprendentes, puesto que ambos plásmidos presentan homologías con la región *nic* de pLS1, y el supuesto sitio de corte de pE194 estaría localizado en el lazo terminal de una de las mayores estructuras secundarias del plásmido, mientras que el sitio de corte de pFX2 se encuentra situado en un lazo interno de la horquilla del origen. Pensamos que la falta de actividad de RepB sobre DNA de pE194 se pudo producir porque no se expuso el sitio de corte como ssDNA, bien porque se necesite la unión previa de la proteína iniciadora a la región *bind* del origen para que se produzca la extrusión de la horquilla (los iterones y la distancia entre éstos y el sitio de corte, son diferentes entre pLS1 y pE194), o bien porque el grado de superenrollamiento del DNA de pE194 no fue suficiente para la generación de la horquilla del origen. Esta segunda posibilidad parecía la más probable, ya que hemos mostrado que la región *bind* de pLS1 no se requiere para la actividad de RepB *in vitro*.

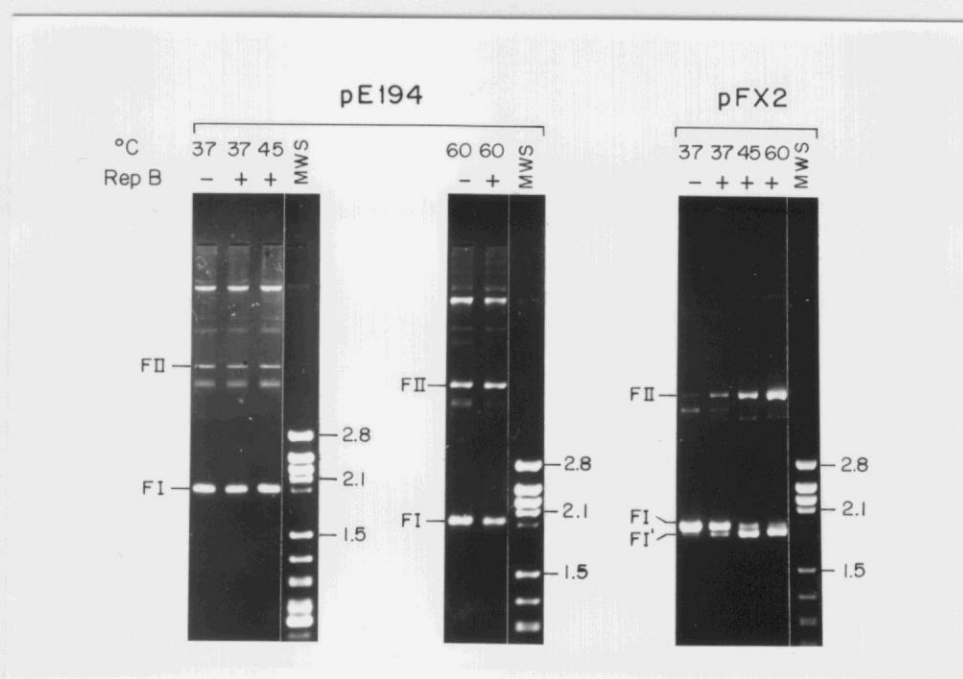


Figura 61. Actividad de RepB sobre plásmidos de la familia pLS1. DNA superenrollado (700 ng) de pE194 y pFX2 se incubó (+) o no (-) con RepB (45 ng), durante 30 min a 37, 45 y 60°C. Los productos de reacción se analizaron en un gel 1% agarosa con 0.5 µg/ml EtBr. MWS: marcador de peso molecular. FI: DNA superenrollado; FII: forma circular abierta; FI': forma circular relajada.

Como una primera aproximación para conocer el grado de superenrollamiento de estos plásmidos, se analizó la distribución de topoisómeros del DNA superenrollado (400 ng) de pLS1, pFX2 y pE194, mediante electroforesis en geles de agarosa con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloroquina del modo ya descrito. Los geles se fotografiaron bajo luz UV, realizándose densitometrías de los negativos (Fig 62). Se pudo comprobar que el número de topoisómeros de pE194 en estas condiciones era bastante reducido y que su distribución fue mucho más asimétrica que en los casos de pLS1 y pFX2. Todo esto favorecería la hipótesis de que la extrusión de la estructura secundaria del *dso* de pE194, y en consecuencia, la exposición de la región *nic* como ssDNA, depende del grado de superenrollamiento del DNA plasmídico. Para comprobar esta hipótesis, se diseñó un experimento en el cual se intentó modular *in vitro* el grado de superenrollamiento del DNA de pE194 y de pLS1 (Keller, 1975; Singleton y Wells, 1982). DNA de pLS1 y pE194 (1.5 μg) se trató o no con topoisomerasa I (15 u) en presencia de distintas concentraciones de EtBr (de 1 a 16 μM , para el pLS1; de 1 a 64 μM , para el pE194). Las reacciones se llevaron a cabo en 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT y 20% de glicerol, en un volumen final de 60 μl y se incubaron durante 2 h a 37°C. Tras la incubación a 37°C, se trataron con fenol y fenol:cloroformo (1:1) y se precipitaron con etanol. El precipitado se disolvió en agua, y la mitad de las muestras se trató con RepB (55 ng) durante 30 min a 60°C. Después se realizó un tratamiento con proteinasa K (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las muestras se analizaron en geles de agarosa (1% en TBE), en presencia o no de pequeñas concentraciones de EtBr (0.014 y 0.016 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para el pLS1; 0.014 y 0.024 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para el pE194). Los geles se tiñeron con 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de EtBr durante 1 h y se fotografiaron bajo luz UV (Fig. 63). Con el tratamiento del DNA plasmídico con topoisomerasa I sin EtBr, se consigue una total relajación del DNA, pero en presencia de aquél, el DNA va adquiriendo vueltas de superenrollamiento negativo cuyo número dependerá de la concentración de EtBr utilizada en la reacción. Se pudo observar que RepB no tiene actividad sobre DNA relajado por la topoisomerasa I, pero sí presentó actividad sobre DNA de pLS1 a todas las concentraciones de EtBr ensayadas, siendo menor como es lógico suponer a la menor cantidad de EtBr ensayada (1 μM). En el caso de pE194, se comprobó que RepB no actúa sobre DNA relajado y no se observó ninguna actividad a las concentraciones de 1, 2 y 4 μM de EtBr; a concentraciones mayores de EtBr, en las

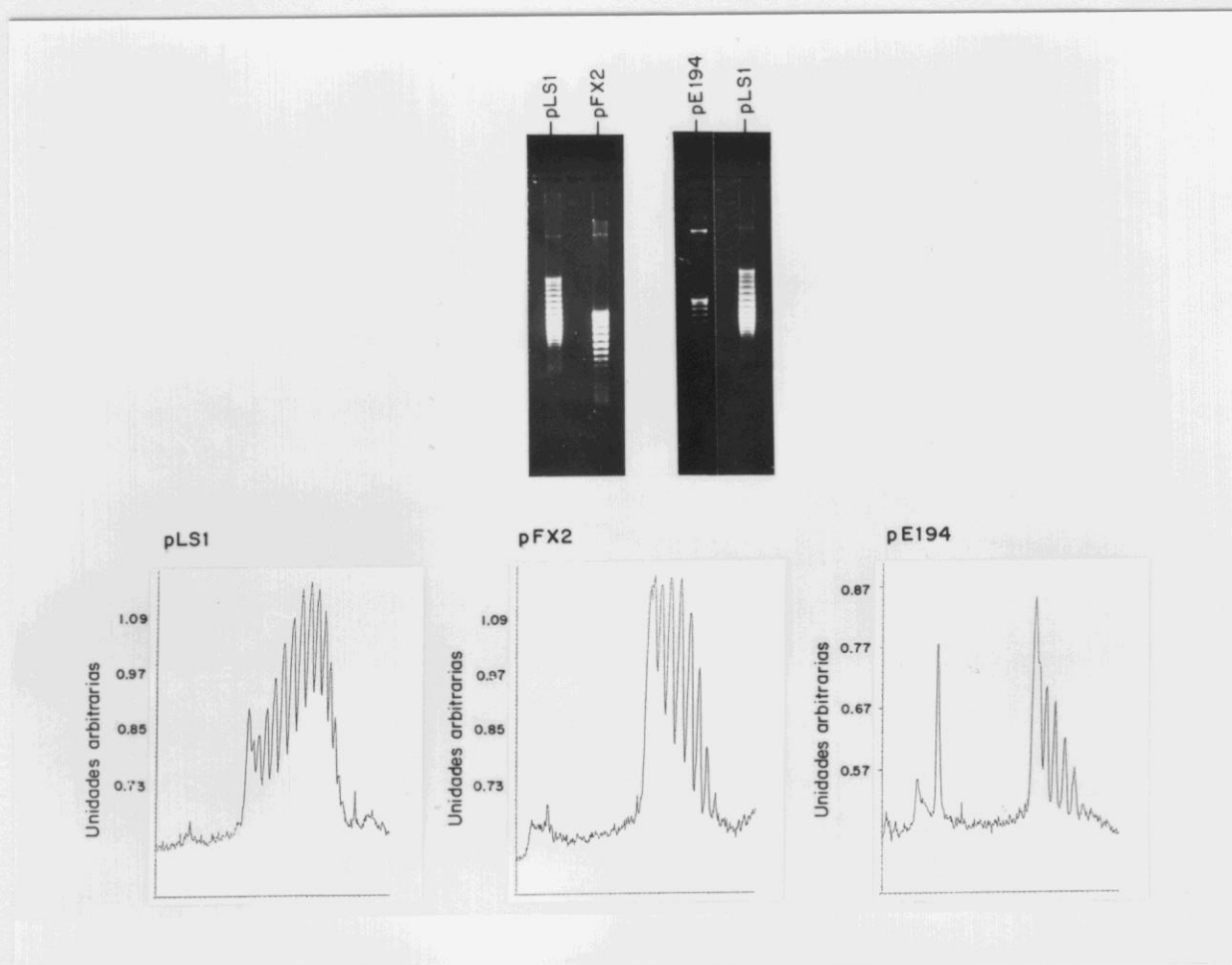


Figura 62. Número y distribución de topoisómeros de los plásmidos pLS1, pFX2 y pE194. DNA superenrollado (400 ng) de estos plásmidos se analizó en un gel 1% agarosa con 2 μ g/ml de cloroquina. Se muestran las densitometrías realizadas a los negativos de estos geles.

que el DNA ha adquirido un mayor grado de superenrollamiento, se pudo observar una clara actuación de la proteína RepB sobre el DNA de pE194.

Para completar el estudio de la actividad de RepB sobre el *dso* de los plásmidos relacionados, se realizaron nuevos ensayos sobre oligonucleótidos monocatenarios. Se sintetizaron tres oligonucleótidos de 23-mer que contienen la región *nic* de pLS1, pFX2 y pE194 (oligos "pL": 5'-GGGGGGGCTACTACG/ACCCCCC-3'; "pF": 5'-TGCTTCCGTACTACG/ACCCCCCA-3' y "pE": 5'-TAGGGGGGTACTACG/ACCTCCCC-3') y se marcaron en su extremo 5'. 1.26 pmol del oligo marcado (2.5 pmol)

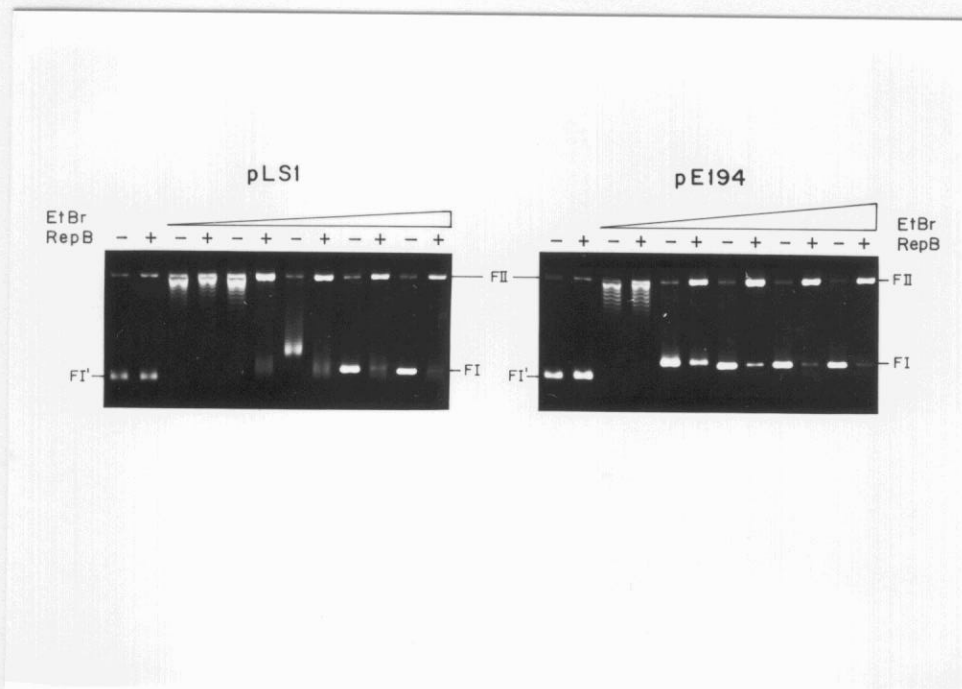


Figura 63. Actividad de RepB sobre DNAs de pLS1 y pE194 con distinto grado de superenrollamiento. Para modular *in vitro* el grado de superenrollamiento del DNA plasmídico (1.5 μ g), las muestras se relajaron (+) o no (-) con topoisomerasa I en presencia de distintas concentraciones de EtBr (0, 1, 2, 4, 8 y 16 μ M, para pLS1 y 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 μ M, para pE194). Tras la fenolización de las muestras, éstas se incubaron (+) o (-) con RepB, durante 30 min a 60°C. Los productos de reacción se analizaron en geles de agarosa con EtBr (0.016 μ g/ml para pLS1 y 0.024 μ g/ml para pE194). Se indica la posición de DNA superenrollado (FI), DNA relajado (FI') y de las formas circular abierta (FII).

para el oligo "pF", con menor eficiencia en el marcaje) se incubó con la proteína RepB (9.3 pmol, y 18.6 pmol para el oligo "pF") durante 30 min a 37, 45 y 60°C. La reacción se paró con proteinasa K (300 μ g/ml). Las muestras se precipitaron con etanol y se analizaron en un gel 20% PAA/8 M urea. Si RepB fuese capaz de reconocer los tres oligos, se obtendrían como productos una banda de 15-mer, ya que en los tres casos el sitio de corte de RepB (/) se encuentra situado a 15 nt del extremo 5' de cada oligo. Como control negativo, se empleó el oligo "comp" (que posee la secuencia complementaria a la región de corte de pLS1) que, como ya hemos demostrado, no es reconocido por RepB. Se pudo observar que los tres oligos con la secuencia de la región *nic* de pLS1, pFX2 y pE194, fueron reconocidos por RepB, generando como producto la banda 15-mer indicada (Fig. 64).

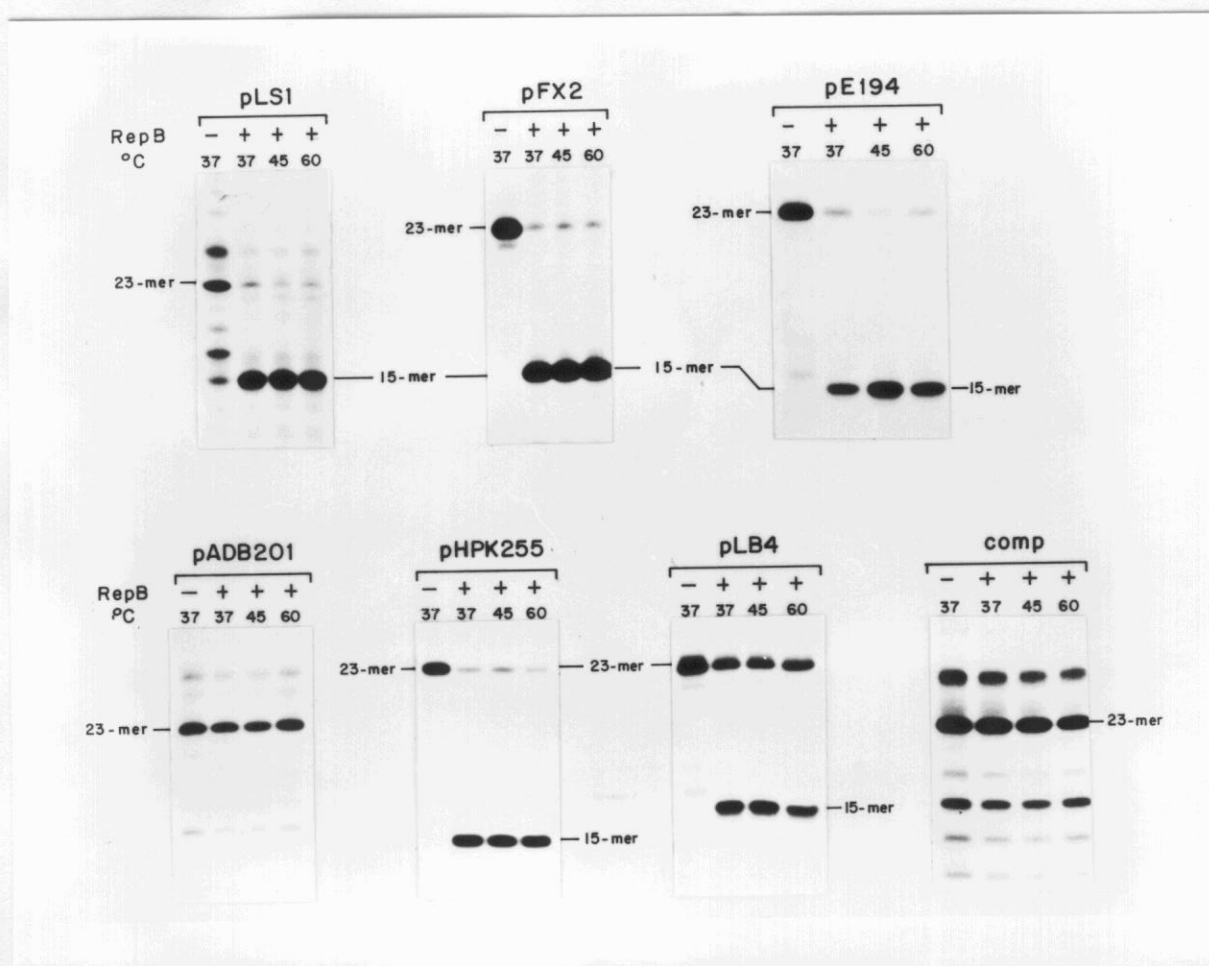


Figura 64. Actividad de corte específico de RepB sobre oligonucleótidos que contienen la región *nic* de los plásmidos pLS1, pFX2, pE194, pADB201, pHPK255 y pLB4 (ver Tabla 7). Como control negativo se utilizó el oligo "comp" (5'-GGGGGGTCGTAGTAGCCCCCCC-3') que contiene la secuencia complementaria al oligo "pL" (pLS1). Las mezclas de reacción contenían 1.26 pmol del oligo marcado (2.5 pmol para el oligo "pF") y se trataron (+) o no (-) con 9.3 pmol de RepB (18.6 pmol para el oligo "pF") y se realizaron incubaciones de 30 min a 37, 45 y 60°C. Los productos se analizaron en geles 20% PAA/8 M urea. Se indican en la figura los tamaños de cada oligo.

El ensayo anterior se repitió con los oligos que contenían la región *nic* de otros plásmidos de la familia, como son pADB201, pHPK255 y pLB4 (Fig. 64). En todos los casos, se calculó el porcentaje de actividad de RepB, cuantificando la banda de 15-mer como producto de la actividad de corte de RepB sobre los oligos (Tabla 9). Los valores obtenidos se refirieron al porcentaje obtenido para el oligo "pL" (considerado como valor 100). Todos los oligos fueron reconocidos por RepB, con la excepción del oligo correspondiente a pADB201. Esto se puede explicar porque este

oligo posee una T en la posición 17 y ya hemos demostrado que en esta posición debe existir una C para el corte por RepB. Además, los resultados nos muestran que RepB admite el cambio C18→ T (pHPK255). Sin embargo, con la substitución C18→ A, se observa una disminución en la eficiencia de corte (pLB4).

Tabla 9. Especificidad de reconocimiento por RepB de orígenes de plásmidos de la familia de pLS1. Se indican las variaciones de secuencia que existen entre la región de pLS1 y los otros miembros de la familia (cajas).

Oligo	Secuencia (5' - 3')	Corte		
		37°C	45°C	60°C
pLS1	G G G G G G C T A C T A C G / A C C C C C C C	100	100	100
pFX2	T G C T T C C G T A C T A C G / A C C C C C C A	139	106	106
pE194	T A G G G G G G T A C T A C G / A C C T C C C C	111	105	91
pADB201	C A G G G G G C T A C T A C G / A T A G C C C C	<10	<10	<10
pHPK255	T T T C G C C C T A C T A C G / A C T A T A T C	132	99	97
pLB4	C A T G G G G G T A C T A C G / A C A C C C C C	50	64	81
Consensus: TACTACG / AC				

Los resultados se expresan como porcentaje de los valores obtenidos para pLS1, los cuales se calcularon como cocientes de DNA digerido/DNA total. Estos valores fueron: 0.682 (37°C), 0.902 (45°C) y 0.95 (60°C). Se indican los cambios de bases, comparado con la secuencia de pLS1

20. DOMINIOS DE LA PROTEÍNA RepB. HIPEREXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DELECCIONADAS EN SUS EXTREMOS N- Y C-TERMINAL.

El alineamiento de las secuencias de las proteínas RepB de la familia pLS1 (ver Fig. 80, Discusión) nos muestra la existencia de un alto porcentaje de homología en la región N-terminal de las proteínas Rep y cierta diversidad en la región C-terminal, que permite, incluso, establecer subgrupos dentro de esta familia. Previamente, se ha comentado que esta familia de plásmidos presenta en su *dso*, una región altamente conservada (región *nic*) y cierta diversidad en sus repeticiones directas (región *bind*). Si establecemos una correspondencia entre estos dos hechos, se podría suponer que la región N-terminal estaría implicada en la actividad de reconocimiento y corte en la región *nic*, y por el contrario, el papel de la región C-terminal sería la unión a los iterones de la región *bind*. Como una aproximación a *grosso modo* a este hecho, se realizaron deleciones en el gen *repB* que afectarían, posteriormente, a las regiones N- y C-terminal de la proteína RepB.

20.1. Delección del gen *repB* en la región 5'

El codón de iniciación (ATG) del gen *repB* se localizó en la coordenada 853 de pLS1, precedido por un sitio atípico de unión a los ribosomas (a.r.b.s.) (de la Campa *et al*, 1990). Sin embargo, se encontró un segundo codón ATG en la coordenada 949 de pLS1 precedido por una posible secuencia Shine-Dalgarno (GGAGTG, en la coordenada 940), que podría codificar para una posible RepB* (similar a lo que ocurre con las proteínas GpA y GpA* de ϕ X174; Langeveld *et al*, 1979). En este caso, se demostró que la putativa RepB*, codificada por el plásmido pLS1 Δ A15, no es suficiente para las funciones de replicación *in vivo* del plásmido (de la Campa *et al*, 1990; del Solar *et al*, 1993b). Basándonos en la presencia de este segundo codón de iniciación, se diseñó un experimento para deleccionar el extremo 5' del gen *repB*, eliminando los primeros 32 codones del gen, y permitiendo que el segundo ATG funcionase como codón de iniciación.

Para construir la delección del gen *repB* en la región 5' se clonó el fragmento *XmnI-PvuII* (1032 pb) de pLS1 en el sitio único *EcoRI* del vector pET5 (Fig. 65A). La idea era clonar el gen *repB* deleccionado bajo el promotor $\phi 10$ situado "corriente arriba" del sitio *EcoRI*, y utilizar el sistema de clonaje vector pET5/huésped BL21(DE3) para la hiperproducción de la proteína deleccionada. El DNA de pLS1 (12 μ g) se digirió con los enzimas *XmnI* y *PvuII* que originan cuatro fragmentos de 153, 944, 1032 y 2279 pb. Para diferenciar, con claridad, el fragmento de 1032 pb (que contiene el gen *repB* deleccionado en 5') de la banda de 944 pb, se realizó una digestión con *BanI*, cuyo sitio único está situado en este fragmento y originará otros dos nuevos de 256 y 688 pb. La banda de 1032 pb se eluyó de un gel de agarosa al 0.8% y se ligó al vector pET5 (linearizado con *EcoRI* y tratado con fosfatasa alcalina).

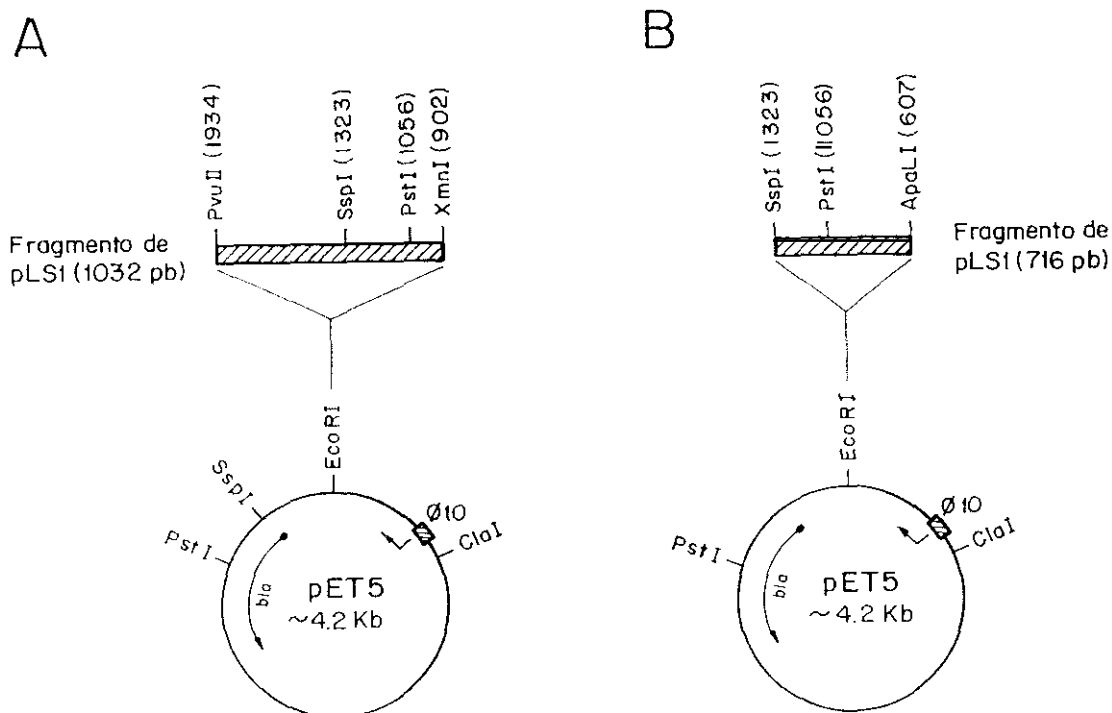


Figura 65. A. Diagrama de la construcción de los plásmidos pLS19 Δ N y pLS19 Δ Ni, que llevan clonado el gen *repB* deleccionado en su extremo 5'. Se clonó el fragmento *XmnI-PvuII* (1032 pb) de pLS1 en el sitio único *EcoRI* del vector pET5. B. Construcción de los plásmidos pLS19 Δ C y pLS19 Δ Cl, que poseen una delección en 3' del gen *repB*. Se clonó el fragmento *ApaLI-SspI* (716 pb) de pLS1 en el sitio único *EcoRI* de pET5. Se indican la posición de algunos sitios de restricción y sus coordenadas de corte.

La ligación se realizó en una relación fragmento:vector de 10:1 y se redigirió con *EcoRI*. La mitad de la ligación se utilizó para transformar *E.coli* BL21 y los posibles transformantes se seleccionaron en presencia de Ap (100 $\mu\text{g/ml}$). Tras 48 h de incubación a 37°C, no se obtuvo ningún transformante. Una cuarta parte de la ligación inicial se usó para transformar *E.coli* BL21(DE3), pero no se obtuvo ningún transformante. Por último, se transformó *E.coli* MC1061, competente según el método de Hanahan (1983) y los transformantes se seleccionaron en medio con Ap (50 $\mu\text{g/ml}$). Sólo se obtuvieron 4 transformantes, y al analizar el contenido plasmídico de estos clones, nos encontramos con tres posibles recombinantes (ya que presentaban un tamaño mayor que el vector pET5, ~4240 pb). Para comprobar en qué orientación se había insertado el fragmento de 1032 pb, se realizaron dos digestiones con *PstI* y *SspI*. Al digerir con *PstI*, se obtendría un fragmento de 1632 pb si el inserto estuviese en la posición correcta (en la dirección del promotor $\phi 10$) o uno de 908 pb si estuviese en la posición incorrecta. Por otro lado, al digerir con *SspI*, los fragmentos serían de 804 pb en la posición correcta y de 614 pb en la incorrecta. De esta forma, se comprobó que dos de los tres recombinantes tenían el inserto en posición incorrecta y sólo uno de ellos, era el clon que buscábamos, el que tenía el inserto (con el gen *repB* deletado) bajo la dirección del promotor $\phi 10$. Se obtuvieron las construcciones pLS19 Δ N (inserto en posición correcta) y pLS19 Δ Ni (posición incorrecta). Para obtener el sistema de expresión que buscábamos, se transformó *E.coli* BL21(DE3) con DNA de los clones obtenidos en MC1061, obteniéndose los recombinantes deseados.

Para comprobar la funcionalidad del sistema vector pET5/huésped BL21(DE3) con las construcciones obtenidas, se calculó el porcentaje de células con plásmido (crecen en medio con Ap) y de células con plásmido y sistema no funcional (crecen en medio con Ap e IPTG) (ver Materiales y Métodos) en tres situaciones distintas: saturación en medio TY, crecimiento exponencial en TY y en medio mínimo M9. Partiendo de un preinóculo en medio con Ap (200 $\mu\text{g/ml}$), se crecieron las células hasta alcanzar la saturación o una $\text{DO}_{600} = 0.45$. Diluciones adecuadas se sembraron en placas con TY-agar suplementadas o no con Ap (200 $\mu\text{g/ml}$) y/o IPTG (125 μM). Se calculó el número de células viables (crecimiento en TY), de células con plásmido (crecimiento en TY + Ap), de células con sistema no funcional (crecimiento en TY + IPTG) y de células con plásmido y sistema no funcional (crecimiento en TY + Ap

+ IPTG). Se estudió la curva de crecimiento de estos cultivos en un medio rico (medio TY; Fig 66A) o medio mínimo M9 (Fig 66B). Los resultados obtenidos para el test de funcionalidad fueron los siguientes:

I) SATURACIÓN EN MEDIO TY

	pL19ΔN	pLS19ΔNi	pET5
Células con plásmido	100%	100%	91.3%
Células con sistema no funcional	0.14%	0.034%	0.10%
Células con plásmido y sistema no funcional	0.03%	0.0075%	0.018%

II) CRECIMIENTO EXPONENCIAL $DO_{600} = 0.45$ EN MEDIO TY

	pLS19ΔN	pLS19ΔNi	pET5
Células con plásmido	86%	87.2%	90.6%
Células con sistema no funcional	4.14%	0.04%	0.096%
Células con plásmido y sistema no funcional	2.41%	0.02%	0.05%

III) CRECIMIENTO EXPONENCIAL $DO_{600} \approx 0.45$ EN MEDIO MÍNIMO M9

	pLS19ΔN	pLS19ΔNi	pET5
Células con plásmido	100%	90.9%	91.3%
Células con sistema no funcional	0.35%	0.09%	0.11%
Células con plásmido y sistema no funcional	0.37%	0.05%	0.07%

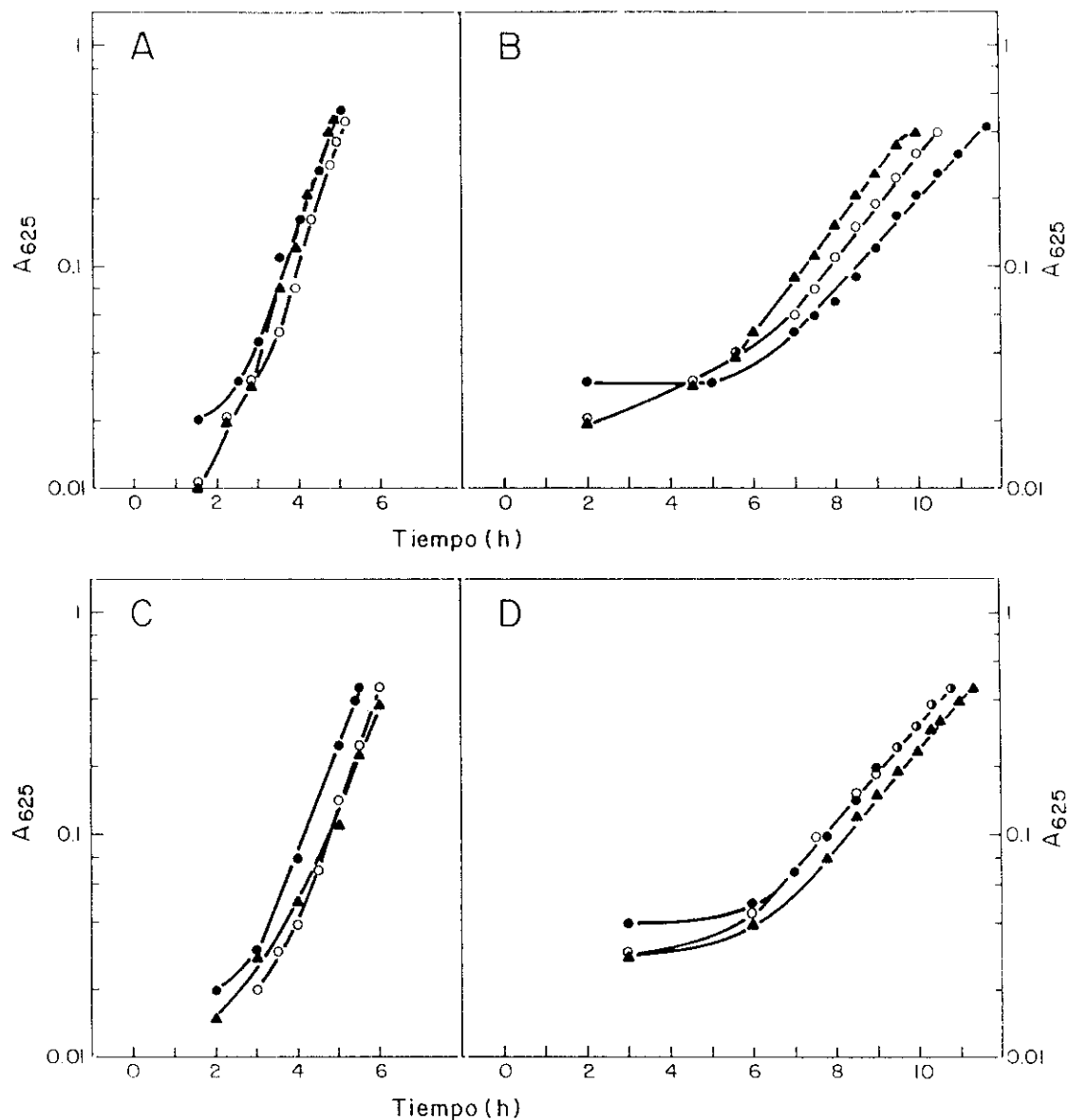


Figura 66. Curvas de crecimiento de los cultivos de *E.coli* BL21(DE3) conteniendo los plásmidos pLS19ΔN (▲), pLS19ΔNi (○) y pET5 (●), en los medios TY (A) y M9 (B); o cultivos de *E.coli* BL21(DE3) con los plásmidos pLS19ΔC (▲), pLS19ΔCi (○) y pET5 (●), en los medios TY (C) y M9 (D). Los cultivos se crecieron en los medios indicados a 37°C con agitación, y se midió la absorbancia A_{625} a distintos tiempos para calcular el tiempo de duplicación de estos cultivos en cada uno de los medios. Representación gráfica del valor de A_{625} frente al tiempo de incubación (horas).

20.2. Deleción del gen *repB* en la región 3'

La deleción del gen *repB* en la región 3' se basó en la eliminación de los 162 pb que codifican los 53 aa finales de RepB. Para ello, se digirió el DNA de pLS1 con *Apa*LI y *Ssp*I, cuyos sitios únicos están situados en las coordenadas 607 y 1323 de pLS1, respectivamente. Esta doble digestión da lugar a dos fragmentos de 716 y 3692

pb. El fragmento de 716 pb se eluyó a partir de un gel 0.8% agarosa y se rellenó el extremo 5' protuberante dejado por el enzima *Apa*LI, con la Pol IK. Este fragmento se ligó al vector pET5 (linearizado con *Eco*RI y tratado con fosfatasa alcalina), en una relación fragmento:vector igual a 10:1 (Fig 65B). Dos tercios de la ligación se utilizaron para transformar *E.coli* MC1061 y los transformantes se seleccionaron en medio sólido con Ap (50 µg/ml). Se obtuvieron unos 8 transformantes/ml y en un primer análisis del DNA (29 clones) se detectaron 24 posibles recombinantes, de los cuales sólo 2 tenían insertado el fragmento en la posición correcta. Para comprobar esto, se realizó una digestión de los posibles recombinantes con *Pst*I. Si el inserto entra en la posición correcta (bajo el promotor ϕ 10 de pET5) se obtiene un fragmento de 1021 pb, y si por el contrario, está en la posición incorrecta, el fragmento es de 1203 pb. Se obtuvieron así, dos clones con el inserto en la posición correcta y 4 con el inserto en la posición inversa. Se escogió un clon de cada tipo y se transformó la estirpe BL21(DE3) con el DNA de estos clones, obteniéndose los plásmidos pLS19 Δ C (posición correcta) y pLS19 Δ Ci (posición incorrecta). Se estudiaron las curvas de crecimiento de estos cultivos en un medio rico (TY; Fig 66C) o en medio mínimo M9 (Fig 66D).

20.3. Hiperexpresión de las proteínas RepB delecionadas en sus extremos N- y C-terminal

Para la expresión de proteínas totales de los cultivos de BL21(DE3) conteniendo el vector pET5 o los plásmidos con el gen *repB* delecionado (pLS19 Δ N, pLS19 Δ Ni, pLS19 Δ C, pLS19 Δ Ci), se prepararon preinóculos en 10 ml de medio M9 con Ap (200 µg/ml), y se crecieron a 37°C hasta una $DO_{600} = 0.2-0.3$. A esta DO se realizaron dos diluciones en M9 con Ap (200 µg/ml) dejando los cultivos a una $DO_{600} = 0.05$. Los cultivos se crecieron a 37°C con agitación, hasta alcanzar una $DO_{600} = 0.45$. En este momento, se añadió 1 mM IPTG a uno de los matraces y se incubó 30 min a 37°C. A continuación, se realizó un tratamiento con Rif (200 µg/ml), 90 min a 37°C. Las células se recogieron por centrifugación y el precipitado proteico se disolvió en 1 ml del tampón de ruptura (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 2 mM EDTA, 1% β ME, 1% glicerol). Las muestras se hirvieron 3 min a 95°C, se concentraron (100 veces) mediante precipitación con 5 volúmenes de acetona fría y se analizaron en geles SDS-PAA al 12%. Se comprobó la expresión de una proteína de unos 20 kDa en los cultivos inducidos con pLS19 Δ N y una fuerte expresión de una proteína de unos 18

kDa en los cultivos con pLS19 Δ C (Fig. 67). Los cultivos no inducidos o aquellos con las construcciones en la posición incorrecta (pLS19 Δ Ni y pLS19 Δ Ci) no presentan variación con respecto al vector. En todos los cultivos inducidos, se observa una mayor expresión del gen de la β -lactamasa de pET5.

Aunque la hiperexpresión fue aceptable (Fig. 67), los intentos realizados para purificar las proteínas RepB truncadas, tanto en su extremo N- como C-terminal, resultaron fallidos. Parece que ambas proteínas truncadas pierden la afinidad por la heparina presentada por la proteína silvestre. También se realizó un ensayo de transcripción-traducción *in vitro*, utilizando los extractos S30 de Promega, para obtener las proteínas delecionadas. Para la obtención del DNA sustrato, se aislaron colonias de los cultivos BL21(DE3) conteniendo los plásmidos pLS19, pLS19 Δ N y pLS19 Δ C. DNA de los clones seleccionados se trató con 100 μ g/ml de RNasa A, durante 15 min a 37°C y se digirió con *Sca*I, cuyo sitio único en los recombinantes se encuentra dentro del gen *bla*. En la transcripción *in vitro*, se recomienda que el DNA recombinante se

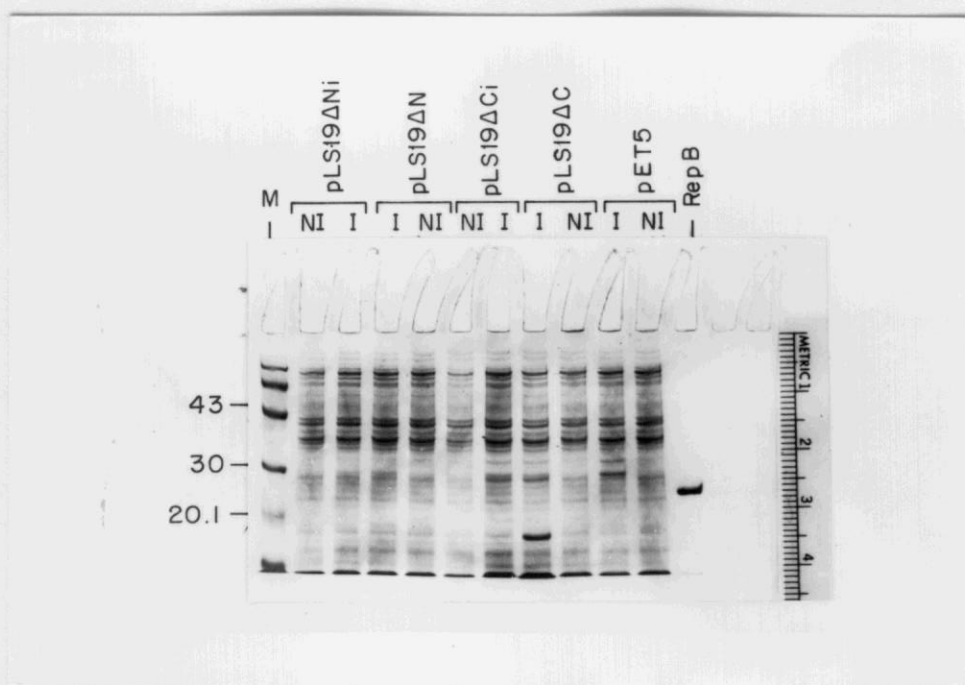


Figura 67. Cultivos de *E.coli* BL21(DE3) conteniendo los plásmidos pLS19 Δ N, pLS19 Δ Ni, pLS19 Δ C, pLS19 Δ Ci y pET5 se crecieron a 37°C, en medio mínimo M9 hasta alcanzar una $DO_{600} = 0.45$. Los cultivos se trataron (I) o no (NI) con 1 mM IPTG (30 min a 37°C) y Rif (200 μ g/ml; 90 min a 37°C). Se prepararon extractos de proteína totales de cada cultivo (concentrando las proteínas 100 veces) y se analizaron en un gel SDS-PAA al 12%.

digiera con un enzima que corte "corriente abajo" del gen que se quiere transcribir. La digestión se incubó con 100 $\mu\text{g/ml}$ de proteinasa K y 0.5% SDS, durante 90 min a 37°C, se fenolizó y precipitó. La reacción de transcripción se realizó con DNA molde digerido (1 μg), los cuatro ribonucleótidos (concentración final de cada uno 1 mM), inhibidor de la RNasa (40 u) y T7 RNA polimerasa (20 u), incubándose 70 min a 37°C. El DNA de las muestras se eliminó mediante tratamiento con DNasa libre de RNasa (1.8 u), durante 15 min a 37°C. Una vez obtenido el RNA de cada muestra, se llevó a cabo la traducción *in vitro* del gen *repB* intacto (pLS19) y delecionado (pLS19 Δ N y pLS19 Δ C), utilizando 15 μCi de ^{35}S -[Met], los extractos S30 de Promega y 25 $\mu\text{g/ml}$ de Rif. La reacción se realizó a 37°C durante 2 h; se separó una alícuota y se realizó un lavado con acetona para eliminar el PEG de las muestras. El análisis de los productos de reacción se realizó en un gel SDS-PAA al 16%. Sólo se observó una banda con el RNA de pLS19 Δ N. Curiosamente, en este plásmido el gen *repB* delecionado se traduciría a partir del segundo ATG, que va precedido por una secuencia Shine-Dalgarno. En las otras dos construcciones, el gen *repB* se traduciría a partir del primer ATG, que se encuentra precedido por la secuencia a.r.b.s. Sin embargo, sabemos que las tres proteínas se expresan en *E.coli*. La mayor o menor eficiencia de traducción en este sistema podría deberse a variaciones en la vida media de estas proteínas. Con el producto obtenido en la traducción del RNA de pLS19 Δ N, se realizó un ensayo de retardo en gel usando el fragmento *NcoI*-*Apa*LI y DNA pC194*cop*/*Dde*I, pero la unión fue totalmente inespecífica (no mostrado).

21. DEFINICIÓN DEL SITIO ACTIVO DE RepB. MUTAGENESIS DIRIGIDA AL RESIDUO Tyr99

Como ya se ha indicado, existen varios motivos de aa conservados entre las proteínas Rep de plásmidos que replican por el mecanismo RC, así como con proteínas iniciadoras de la replicación de geminivirus y proteínas Tra/Mob de plásmidos conjugativos (Ilyina y Koonin, 1992). El motivo 3 (UXXYUXkXXX o UXXYUXhXXX; donde U representa un residuo hidrofóbico y X, cualquier residuo), situado hacia la mitad C-terminal de las proteínas Rep, contendría un residuo Tyr conservado que podría estar implicado en la unión covalente al DNA. Realizando

alineamientos entre las proteínas Rep de la familia de pLS1, hemos identificado ese residuo en la región R-IV conservada entre todos los miembros de esta familia (ver Fig. 80 en Discusión). En la proteína RepB de pLS1, ese residuo correspondería a la Tyr99. Como objetivo nos planteamos realizar una mutagénesis a dicho residuo y comprobar si la proteína mantenía o no su actividad nucleotidil-transferasa.

21.1. Mutagénesis dirigida al codón Tyr99 de RepB

La aproximación más directa para analizar la función de corte y cierre de RepB fue la de sustituir el residuo Tyr99 por residuos como Ser o Phe que podrían conservar, al menos en parte, la función de RepB. Las mutaciones puntuales realizadas en *repB* se llevaron a cabo utilizando un sistema de mutagénesis dirigida *in vitro* (ver Materiales y Métodos). Como DNA sustrato se utilizó el plásmido pALT7:*cr-cat* (que lleva ligado el fragmento *HgiI-ClaI* mayor de pJS3 al fragmento mayor *PstI-ClaI* de pALTER-1, y por tanto, contiene los genes *copG* y *repB* de pLS1, y el *cat* de pJS3 bajo el promotor de la T7 RNA polimerasa del pALTER-1). Las mutaciones puntuales a realizar consistieron en el cambio de la A (nt 1148 de pLS1) por una T o C, con lo que se produce el cambio de triplete TAT (Tyr99) por TTT (Phe) o TCT (Ser) (Fig. 68). Para ello, se utilizaron los siguientes oligos mutagénicos: oligo Y99F (5'-TGTCGAAAATATGTATTTGTTTTTAACGCACGAGAGC-3'; 37-mer) para el cambio de Tyr a Phe y el oligo Y99S (5'-TGTCGAAAATATGTATTTGTCTTTAACGCACGAGAGC-3'; 37-mer) para el cambio de Tyr a Ser; previamente fosforilados en su extremo 5' por la T4 PNK. Para la reacción de mutagénesis se anilló DNA de pALT7:*cr-cat* desnaturalizado (0.1 pmol) con el oligo reparador del gen *bla* (0.25 pmol) y el oligo mutagénico correspondiente (2.5 pmol), ambos fosforilados. El DNA sintetizado usando T4 DNA polimerasa y T4 DNA ligasa, se utilizó para electroporar *E.coli* BMH71-18*mutS*, incapaz de reparar los desapareamientos introducidos. Para asegurar la segregación de los plásmidos mutantes, se realizó una segunda ronda de transformación empleando esta vez *E.coli* JM109. Los transformantes se seleccionaron en medio sólido con Ap (125 µg/ml) y se comprobó la presencia de la mutación deseada por secuenciación del fragmento de DNA correspondiente. Para la secuenciación, el DNA (2 µg) se desnaturalizó por álcali y se anilló al oligonucleótido de 17-mer (5'-CCAGTTFACCTGCAGATAG-3'; situado entre las coordenadas 1045 y 1061 de pLS1), usado como cebador en una

826
 . a.r.b.s. RepB —————>
 5' -AAACATTTCTTGGGTATATTATACTTT**AT**GGCTAAAGAAAAAGCAAGATACTTCACT-
 3' -TTTGTAAGAACCCATATAATATGAAATACCGATTTCTTTTTCGTTCTATGAAGTGA-
 882
 .
 TTTTACTTTATCCTGAATCAATTCCAAGCGACTGGGAGCTGAAACTTGAAACGCTTGGA-
 AAAAATGAAATAGGACTTAGTTAAGGTTTCGCTGACCCTCGACTTTGAACTTTGCGAACCT-
 942
 .
 GTGCCGATGGCAATTAGTCCATTGCATGATAAGGATAAGAGTAGTATCAAAGGACAAAAA-
 CACGGCTACCGTTAATCAGGTAACGTACTATTCTTCTCATCATAGTTTCCTGTTTTT-
 1002
 .
 TATAAGAAAGCTCATTATCATGTGCTTTATATAGCTAAAAATCCAGTTACTGCAGATAGT-
 ATATTCTTTCGAGTAATAGTACACGAAATATATCGATTTTATAGGTCAATGACGTCTATCA-
 1062
 .
 GTACGTAAAAAGATTAAATTATTGCTTGGTGAAAAAAGTCTTGCAATGGTGCAGGTTGTT
 CATGCATTTTTCTAATTTAATAACGAACCACTTTTTTTCAGAACGTTACCACGTCCAACAA
 1122
 .
 Y99
 CTCAATGTCGAAAAATATGTATTTGT**TATTT**AACGCACGAGAGCAAGGACGCTATTGCTA-3'
 GAGTTACAGCTTTTATACATAAACATAAATTGCGTGCTCTCGTTCCTGCGATAACGAT-5'
 1180
 .
 5' -TGTCGAAAAATATGTATTTGT**TATTT**AACGCACGAGAGC-3'
 Oligo Y99F (37-mer)
 5' -TGTCGAAAAATATGTATTTGT**CTTT**AACGCACGAGAGC-3'
 Oligo Y99S (37-mer)

Figura 68. Secuencia de nucleótidos de pLS1 desde la coordenada 826 a 1180, que incluyen parte del gen *repB*. Se indican el sitio atípico de unión a los ribosomas (a.r.b.s.; subrayado) y el codón de iniciación (ATG; en negrita) del gen *repB*. Se muestran los oligos mutagénicos empleados para introducir mutaciones en el codón de Y99 (TAT; en negrita), cambios de Tyr a Phe (TTT) y Ser (TCT).

relación cebador:molde (en moléculas) de 10:1. La mutación Y99F se consiguió fácilmente (1 clon de 4 clones secuenciados), pero para conseguir la mutación Y99S fue necesario secuenciar 25 candidatos, de los cuales sólo dos presentaban la mutación deseada. De esta forma, obtuvimos los plásmidos pALT7Y99F y pALT7Y99S.

21.2. Hiperexpresión de RepBY99F y RepBY99S

Una vez obtenidos los plásmidos pALT7Y99F y pALT7Y99S, se transformó con ellos la estirpe BL21(DE3) mediante electroporación. Como control se realizó una electroporación usando DNA del vector pALTER-1. Se seleccionaron los transformantes por selección en placas con Ap o Tc (para pALTER-1). Se analizó el contenido en DNA plasmídico de varios clones y se escogió uno de ellos en cada caso. Para comprobar que el sistema obtenido era funcional, se procedió a la expresión de proteínas totales del sistema. Los cultivos de BL21(DE3) conteniendo los plásmidos pALT7Y99F, pALT7Y99S y pALTER-1, se crecieron en medio mínimo M9 suplementado con el antibiótico correspondiente hasta una $DO_{600} = 0.45$. En este punto se indujo con 1 mM IPTG (30 min a 37°C) seguido de adición de Rif (90 min a 37°C). Se incluyeron controles de cada cultivo que no fueron inducidos con IPTG. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 1 ml de tampón de ruptura. Estos extractos se precipitaron con 5 volúmenes de acetona fría y se analizaron en geles SDS-14% PAA. En estas condiciones se obtuvo una buena expresión de las proteínas mutantes RepBY99F y RepBY99S (no mostrado).

21.3. Purificación de las proteínas RepBY99F y RepBY99S.

La purificación de estas dos proteínas se realizó de forma muy similar a la purificación de RepB, aunque encontramos una diferencia clara en la solubilidad de las proteínas mutantes respecto a la proteína silvestre. Para la purificación de las proteínas mutantes se preparó un preinóculo de *E.coli* BL21(DE3) con los plásmidos pALT7Y99F o pALT7Y99S en 30 ml de M9 con Ap (125 μ g/ml), y se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar una $DO_{600} = 0.3$. Se realizó una dilución del preinóculo para dejarlo aproximadamente a una $DO_{600} = 0.008$, en 1 l del mismo medio, y se incubó a 37°C hasta que el cultivo llegó a una $DO_{600} = 0.45$. En este punto, se realizó una inducción del sistema como en el Apartado anterior. Las etapas de lisis, precipitación con sulfato de Sm (25%) y con sulfato amónico (70% de saturación)

se realizaron de igual forma que para la purificación de RepB (ver Materiales y Métodos). El precipitado de sulfato amónico se disolvió en 7.5 ml del tampón H suplementado con 300 mM KCl y se dializó frente a 1 l del mismo tampón. Se separaron las proteínas precipitadas de las solubles por centrifugación. Ambas proteínas mutantes se encontraron mayoritariamente en el sobrenadante, por lo que éste se dializó frente al tampón H sin adición de KCl. Para la purificación de RepB silvestre, esta diálisis fue importante debido a que RepB pierde solubilidad a baja sal y así, se obtiene un enriquecimiento de la preparación en esta proteína. Como no conocíamos el comportamiento de las proteínas mutantes, tras la diálisis sin adición de KCl, se separaron por centrifugación las proteínas solubles de las insolubles en estas condiciones. El sedimento se disolvió en 10 ml del tampón H con 300 mM KCl y a su vez, se ajustó la concentración de sal del sobrenadante a 300 mM KCl (volumen final, 11 ml). Ambas partes se aplicaron a una columna de heparina-agarosa, equilibrada en el mismo tampón. Tras aplicar la muestra, se realizó un lavado con el tampón H suplementado con 300 mM KCl (de 6 a 10 volúmenes de columna) y las proteínas adsorbidas a la matriz se eluyeron con un gradiente lineal de 300 a 600 mM de KCl (60 ml), a un flujo constante de 10 ml/h. Se recogieron fracciones de 1 ml y se analizaron 100 μ l de las fracciones que eluyeron entre 350 y 550 mM de KCl, precipitándolas con TCA y cargándolas en un gel de SDS-PAA al 14%. Las proteínas mutantes RepBY99F y RepBY99S se encontraron tanto en el sedimento como en el sobrenadante, aunque el rendimiento obtenido en este último fue muy superior. Se mezclaron las seis fracciones centrales que eluyeron entre 450 y 475 mM de KCl, por su mayor contenido en la proteína de interés (RepBY99F, fracciones 133 a 138 y RepBY99S, fracciones 131 a 136). Se repartieron en alícuotas de 100 μ l/tubo y se congelaron directamente a -70°C para su conservación. El cálculo aproximado de la concentración proteica de las preparaciones obtenidas, se realizó por densitometría directa de geles de SDS-PAA al 16%, tomando como referencia el valor obtenido para las bandas de la proteína RepB silvestre, cuya concentración se calculó previamente por análisis de su composición de aa. Se obtuvieron los valores de 17.3 ng/ μ l para la proteína RepBY99F y de 45.5 ng/ μ l para RepBY99S.

22. ACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS RepB MUTANTES

Para comprobar la actividad de las proteínas mutantes, se realizó un ensayo incubando DNA de pMV158 (700 ng) con las proteínas RepB (4 μ l, 223 ng), RepBY99F (4 y 8 μ l, 69.3 y 138.6 ng) y RepBY99S (4 y 8 μ l, 182 y 364 ng) durante 30 min a de 37, 45 y 60°C (la mayor concentración proteica de cada ensayo sólo se incubó a 60°C). Las reacciones se trataron del modo habitual, analizándose los productos de reacción en un gel de agarosa (1% en TBE con 0.5 μ g/ml de EtBr). Los resultados mostraron que ambas proteínas mutantes habían perdido su capacidad de corte y de corte/cierre sobre DNA suuperenrollado de pMV158 (Fig.69).

Dado que los ensayos con oligonucleótidos mostraron ser más sensibles que cuando se usó DNA superenrollado, se ensayó la actividad de las proteínas mutantes sobre este tipo de sustrato. Para ello, se realizó un ensayo utilizando el oligo de

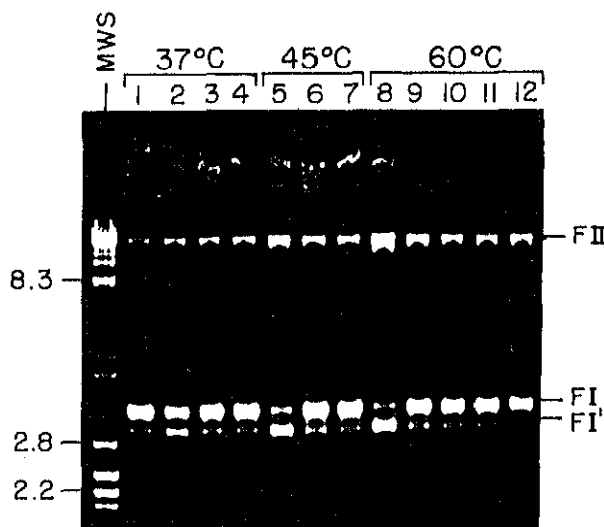


Figura 69. Actividad de las proteínas mutantes RepBY99F y RepBY99S sobre DNA superenrollado. DNA de pMV158 (700 ng) se incubó con las proteínas RepB (4 μ l, 223 ng; carriles 2, 5 y 8), RepBY99F (4 μ l, 69.3 ng, carriles 3, 6 y 9; 8 μ l, 138.6 ng, carril 10) y RepBY99S (4 μ l, 182.1 ng, carriles 4, 7 y 11; 8 μ l, 364.2 ng, carril 12) durante 30 min a 37, 45 y 60°C (la mayor concentración proteica de cada ensayo sólo se incubó a 60°C). Los productos de reacción se analizaron en un gel 1% agarosa en TBE con 0.5 μ g/ml de EtBr. MWS: marcador de peso molecular.

26-mer (5'-GGGGCTACTACG/ACCCCCCTATAGT-3') que contiene el sitio de corte de RepB (/). Este oligonucleótido se marcó en su extremo 5' y se incubó (1.26 pmol) con dos concentraciones distintas de las proteínas RepB (5.75 y 11.5 pmol), RepBY99F (3.55 y 6.39 pmol) y RepBY99S (4.67 y 9.35 pmol), durante 30 min a 37, 45 y 60°C. La reacción se paró por tratamiento con proteinasa K y el DNA se precipitó. Tras ajustar las cpm, los productos se analizaron en un gel de secuencia 20% PAA/8 M urea. Los resultados (Fig. 70A) mostraron la aparición de una banda débil de 12-mer (resultado de la actividad de corte sobre el oligo) en las muestras tratadas con la proteína RepBY99F a 45 y 60°C (17% de actividad de la proteína silvestre, en ambos casos), pero no se observó ningún tipo de actividad con la proteína RepBY99S.

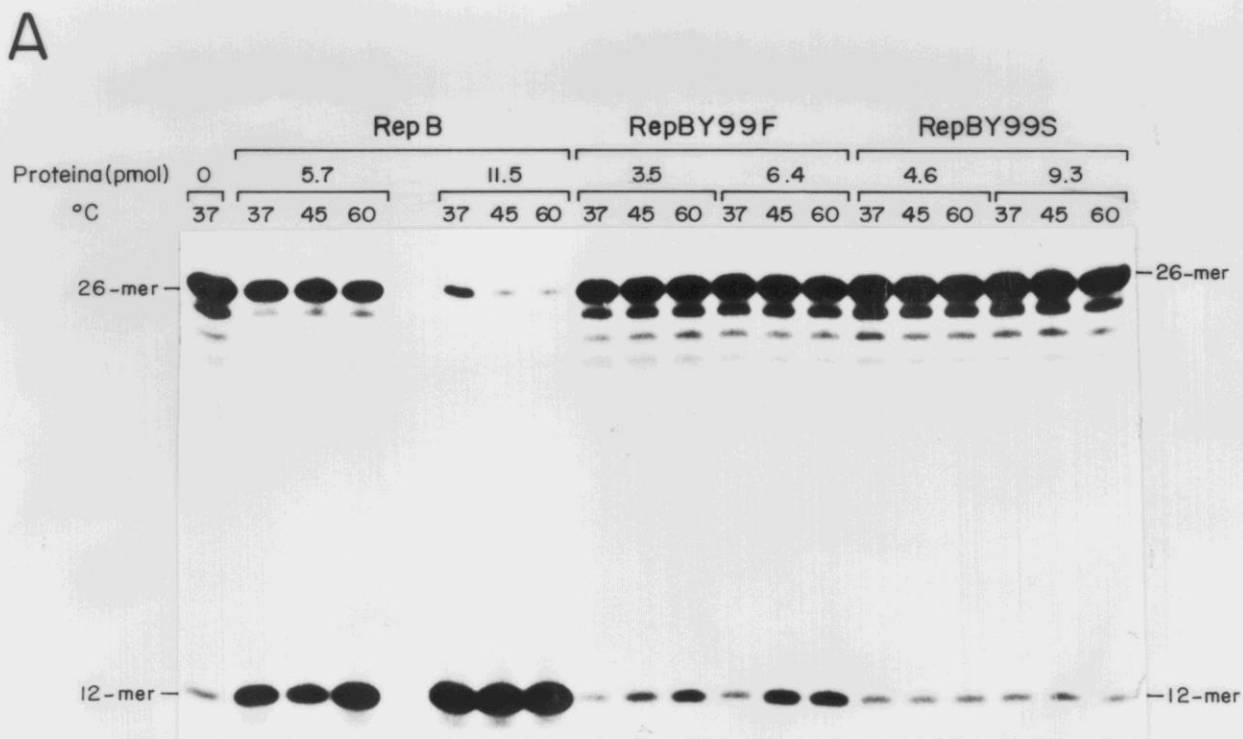


Figura 70. Actividad de las proteínas RepBY99F y RepBY99S sobre oligonucleótidos. **A.** 1.26 pmol del oligo de 26-mer (5'-GGGGCTACTACG/ACCCCCCTATAGT-3') que contiene el sitio de corte de RepB (/) se marcó en su extremo 5' y se incubó con dos concentraciones distintas de las proteínas RepB (5.7 y 11.5 pmol), RepBY99F (3.5 y 6.4 pmol) y RepBY99S (4.6 y 9.3 pmol), durante 30 min a 37, 45 y 60°C.

La posible actividad de cierre y nucleotidil-transferasa de las proteínas mutantes se ensayó mediante uso de dos oligonucleótidos con diferente tamaño y conteniendo el sitio de corte de RepB (/). Se empleó el oligonucleótido de 26-mer (5'-GGGGC TACTACG/ACCCCCCTATAGT-3') marcado en su extremo 5' y un oligo de 23-mer (5'-GGGGGGGCTACTACG/ACCCCCC-3'). Para cada reacción se mezclaron 1.26 pmol del oligo 26-mer marcado con 2.52 pmol del oligo 23-mer, y se incubaron con dos concentraciones distintas de cada proteína: RepB (2.99 y 5.75 pmol), RepBY99F (1.85 y 3.55 pmol) y RepBY99S (2.43 y 4.67 pmol), durante 30 min a 37, 45 y 60°C. La reacción se paró de la misma forma que en el ensayo anterior y se analizaron los productos en un gel de secuencia 20% PAA/8 M urea. Si se produce el corte y cierre de ambos oligonucleótidos, por intercambio de las dos mitades obtenidas en cada caso, además de la banda de 12-mer (producto del corte del oligo de 26-mer marcado), aparecerá una banda nueva de 20-mer, producto de la unión de

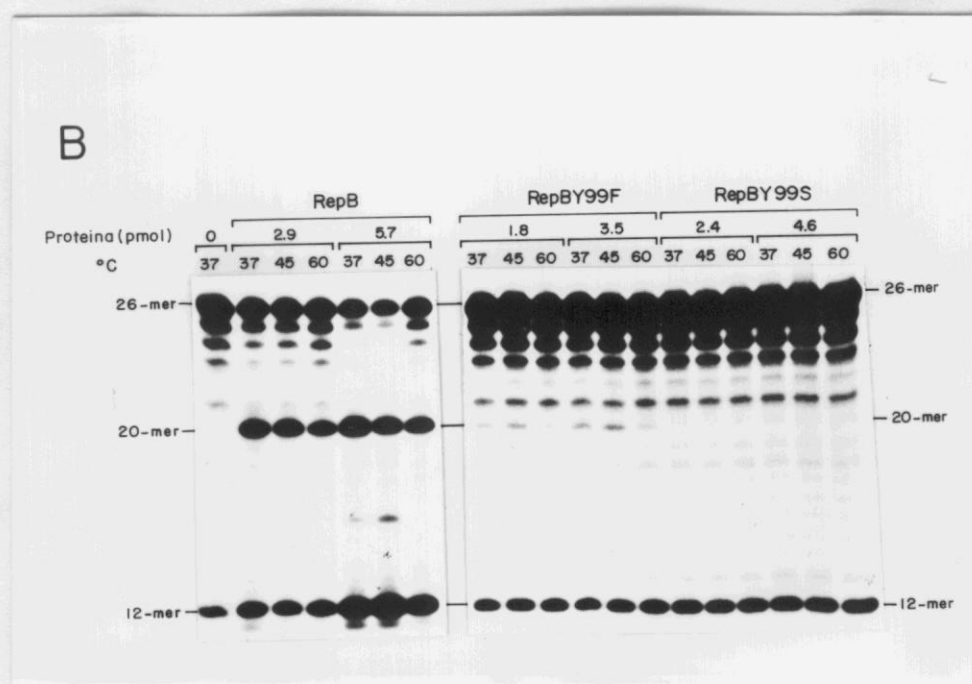


Figura 70. B. Se mezclaron 1.26 pmol del oligo 26-mer marcado con 2.52 pmol del oligo 23-mer (5'-GGGGGGGCTACTACG/ACCCCCC-3'), y se incubaron con dos concentraciones distintas de cada proteína: RepB (2.9 y 5.7 pmol), RepBY99F (1.8 y 3.5 pmol) y RepBY99S (2.4 y 4.6 pmol), durante 30 min a 37, 45 y 60°C. Los productos de reacción se analizaron en un gel de secuencia 20% PAA/8 M urea.

la banda de 12-mer con la mitad derecha de 8-mer, ésta producida por el corte al oligo de 23-mer. Los resultados (Fig. 70B) mostraron la existencia de una banda tenue de 20-mer en las muestras tratadas con la proteína RepBY99F, lo que indica cierta actividad residual en esta proteína (con un valor de 0.7-0.9% respecto a la proteína RepB silvestre) y nuevamente, no se observó actividad en la proteína RepBY99S.

Los resultados obtenidos permiten concluir que el residuo Tyr99 parece el principal responsable de la actividad de corte y corte/cierre de RepB. No obstante, la proteína mutante RepBY99F mantuvo actividad residual. El cambio de Tyr a Phe es conservativo ya que se mantiene el mismo grupo hidrofóbico, pero se esperaba que si alguna proteína presentaba cierta actividad sería RepBY99S porque conserva el grupo -OH implicado posiblemente en el ataque nucleofílico. Por otra parte, se puede argumentar que, en el caso de RepBY99F, la actividad residual observada se debería a que el grupo nucleofílico -OH podría ser proporcionado por el residuo Tyr97 de RepB. Lógicamente, será necesario realizar otros cambios en Tyr99 así como mutagenizar Tyr97 para apoyar o rechazar esta hipótesis.

23. UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS RepB SILVESTRE Y MUTANTES A LA REGIÓN bind DEL dso

Quedaba por analizar si las proteínas RepB mutantes tienen afectada su capacidad de unión a DNA. Para ello, se realizaron ensayos de unión a fragmentos lineales de dsDNA. Los ensayos se realizaron con el fragmento *NcoI-ApaLI* (227 pb) de pLS1Δ24*cop7*, que contiene las dos regiones (*nic* y *bind*) del *dso* de pLS1. Se realizó una digestión doble del DNA con *NcoI* y *ApaLI*, generándose tres fragmentos de 227, 1570 y 2040 pb. El fragmento más pequeño (227 pb) se eluyó de un gel 5% PAA y se marcó con Pol IK y [α -³²P]dTTP. El fragmento *NcoI-ApaLI* (0.043 pmol, 6.4 ng) marcado se incubó con distintas concentraciones de las proteínas RepB (5.5, 7.4 y 9.2 pmol; Fig. 71A), RepBY99F (2.8, 3.5, 4.2, 4.9 y 6.4 pmol; Fig. 71B y D) y RepBY99S (0.9, 1.8, 3.7, 5.6 y 7.5 pmol; Fig. 71C y D), en el tampón B en ausencia de MnCl₂ en un volumen de 10 μ l, durante 30 min a t.a. Se añadió el tampón de carga

BXGE y se analizaron las muestras en un gel 5% PAA nativo. Se observó retención del fragmento que contiene el *dso* con las tres proteínas ensayadas (siendo más acusada con la proteína RepBY99S), lo que indica que las proteínas mutantes no habían perdido su capacidad de unión a DNA (Fig.71).

En un segundo ensayo se usó un fragmento de 50 pb, conteniendo únicamente los tres iterones de la región *bind* del origen. Este fragmento se obtuvo por digestión del plásmido pC3BA con *Bam*HI y *Bgl*II, cuyos sitios se encuentran a ambos lados de los iterones. El DNA se purificó de geles nativos de PAA y se marcó (0.2 μ g) en su

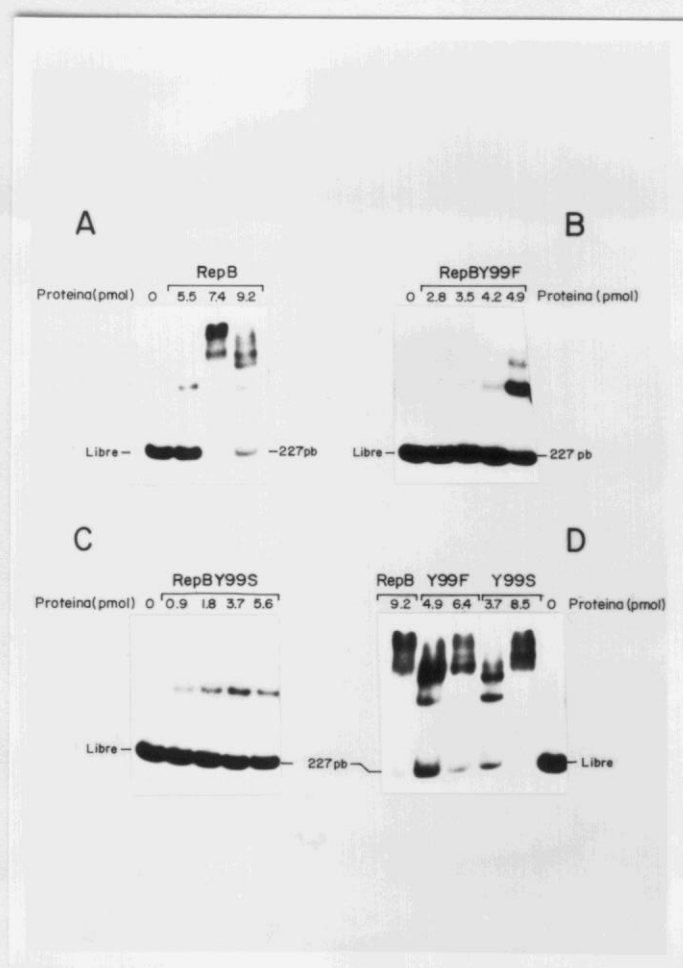


Figura 71. Unión de las proteínas mutantes al *dso* de pLS1. El fragmento *Nco*I-*Apa*LI de 227 pb (0.043 pmol, 6.4 ng) marcado se incubó con las siguientes concentraciones proteicas: **A.** Proteína RepB (5.5, 7.4 y 9.2 pmol), **B.** Proteína RepBY99F (2.8, 3.5, 4.2 y 4.9 pmol), **C.** Proteína RepBY99S (0.9, 1.8, 3.7 y 5.6 pmol) y **D.** Proteína RepB (9.2 pmol), RepBY99F (4.9 y 6.4 pmol) y RepBY99S (3.7 y 8.5 pmol). La incubación se realizó en el tampón B en ausencia de $MnCl_2$, durante 30 min a t.a. Se añadió el tampón de carga BXGE y se analizaron las muestras en un gel 5% PAA nativo.

extremo 3' con Pol IK y [α - 32 P]dGTP. Los ensayos de unión se realizaron incubando 0.092 pmol (3 ng) del fragmento marcado con dos concentraciones distintas de las proteínas RepB, RepBY99F y RepBY99S, manteniendo una relación proteína/DNA (en pmol) igual a 15 y 30. Los ensayos se realizaron como antes y las muestras se analizaron en un gel 5% PAA nativo. Los resultados (Fig 72A) mostraron la presencia de bandas de DNA retardadas en las muestras con las proteínas (algo superior con RepBY99S). Como control negativo se utilizó DNA de pC194*cop* cortado con *Dde*I (fragmentos de 38, 609, 613 y 1647 pb) y marcado en sus extremos 3' con Pol IK y [α - 32 P]dTTP. El DNA de pC194*cop*/*Dde*I marcado se incubó con distintas concentraciones de las proteínas RepB (1.8 pmol), RepBY99F (0.7 y 1.4 pmol) y RepBY99S (0.5 y 0.9 pmol). Las muestras se analizaron en un gel 5% PAA nativo (Fig. 72B). Se observó cierta unión inespecífica de la proteína RepBY99S al DNA de pC194*cop* y sólo el fragmento mayor de 1647 pb presenta tres regiones con un 74%

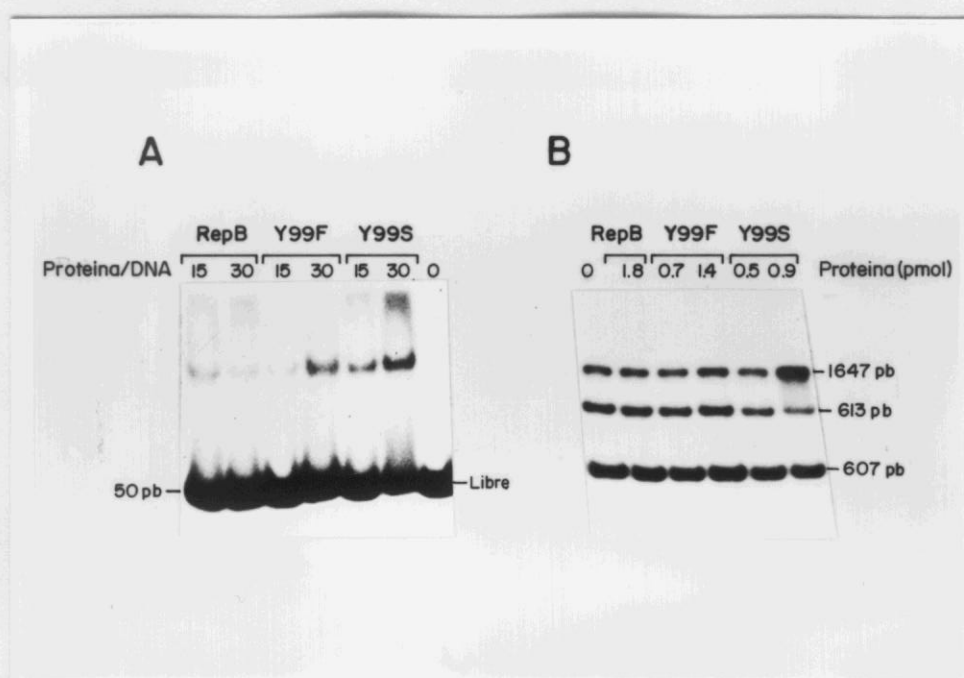


Figura 72. A. Unión de las proteínas RepB, RepBY99F y RepBY99S a la región *bind* del *dso* de pLS1. Para realizar los ensayos se incubaron 0.092 pmol (3 ng) del fragmento marcado *Bam*HI-*Bgl*II (50 pb) con dos concentraciones distintas de las proteínas RepB, RepBY99F y RepBY99S, manteniendo una relación proteína/DNA en pmol igual a 15 y 30. La incubación se realizó en el tampón B en ausencia de MnCl_2 , durante 30 min a t.a., a las muestras se les añadió el tampón de carga BXGE y se analizaron directamente en un gel 5% PAA nativo. **B.** Unión inespecífica de las proteínas RepB, RepBY99F y RepBY99S. DNA de pC194*cop*/*Dde*I marcado se incubó con las proteínas RepB (1.8 pmol), RepBY99F (0.7 y 1.4 pmol) y RepBY99S (0.5 y 0.9 pmol), en el tampón B en ausencia de MnCl_2 , durante 30 min a t.a. Se añadió el tampón de carga BXGE y se analizaron las muestras en un gel 5% PAA nativo.

de homología con los iterones de pLS1. Las proteínas RepB y RepBY99F no presentaron unión al DNA de pC194*cop*, sino que su capacidad de unión a DNA es específica del *dso* de pLS1.

Para conocer si RepB era capaz de unirse a un oligonucleótido con la región *nic* del *dso* de pLS1, en ausencia de $MnCl_2$, se realizó un ensayo con el oligonucleótido de 26-mer (5'-GGGGCTACTACGACCCCCCTATAGT-3'). A partir de una mezcla inicial del oligonucleótido marcado (7.56 pmol) y tampón B, en un volumen de 45 μ l, se prepararon seis muestras (1.26 pmol del oligo) que fueron tratadas o no con distintas cantidades de RepB (entre 2.78 y 13.91 pmol), en ausencia de $MnCl_2$. Se realizó una incubación de 15 min a 37°C (con la excepción de una muestra con 9.28 pmol de RepB que fue incubada a t.a. para ralentizar la reacción de unión) y tras añadir el tampón de carga BXGE, las muestras se analizaron inmediatamente en un gel 20% PAA nativo. No se observó ninguna banda retardada a ninguna de las concentraciones de proteína ensayadas (Fig. 73). Si bien el oligo usado tiene el sitio

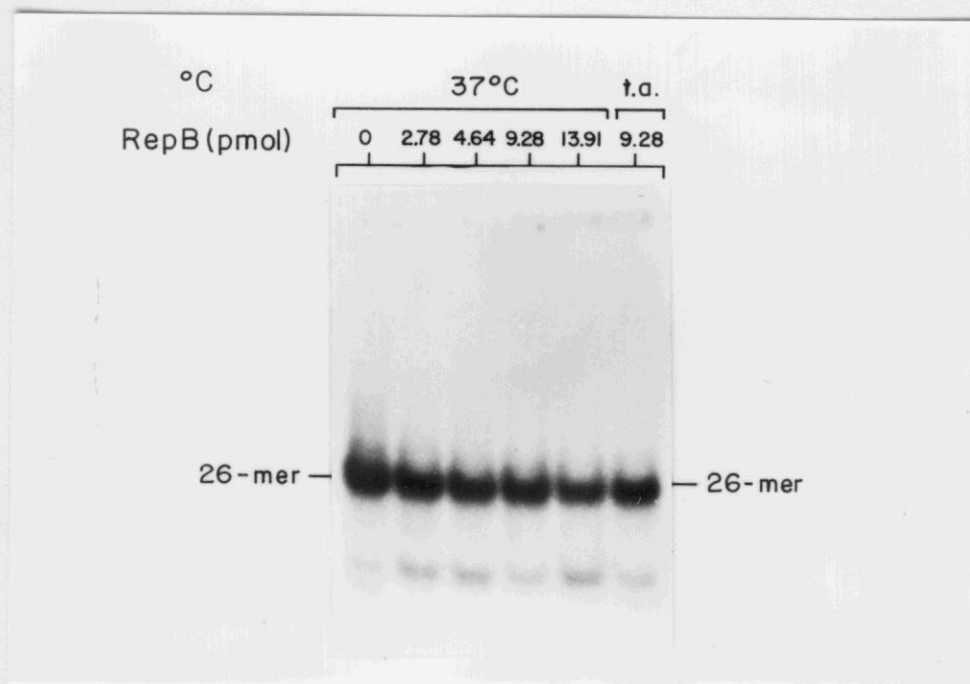


Figura 73. Unión de RepB a un oligonucleótido que contiene la región *nic* del origen del pLS1. El oligo de 26-mer 5'-GGGGCTACTACG/ACCCCCCTATAGT-3' que contiene el sitio de corte de RepB (/) se marcó en su extremo 5'. A partir de una mezcla inicial del oligonucleótido marcado (7.56 pmol) y tampón B, en un volumen de 45 μ l, se prepararon seis muestras (1.26 pmol del oligo) que fueron tratadas o no con distintas cantidades de RepB (2.78, 4.64, 9.28 y 13.91 pmol), en ausencia de $MnCl_2$. Se realizó una incubación de 15 min a 37°C (con la excepción de una muestra con 9.28 pmol de RepB que fue incubada a t.a.) y tras añadir el tampón de carga BXGE, las muestras se analizaron inmediatamente en un gel 20% PAA nativo.

de corte de RepB, la ausencia de Mn^{2+} debería permitir solamente la unión de la proteína al DNA sin digerirlo. Por tanto, en las condiciones ensayadas, no hemos podido observar una unión entre este oligo monocatenario y RepB, que se hiciese patente en un ensayo de retardo en gel.

Concluimos que la proteínas RepB silvestre y RepBY99F poseen la capacidad de unirse específicamente al *dso* de pLS1. Para la proteína RepB silvestre hemos comprobado que se une específicamente a la región *bind* del origen y que no se observa unión a la región *nic*, en ausencia de Mn^{2+} . Aunque la proteína RepBY99S se unió al *dso* de pLS1, de forma más acusada que las dos proteínas anteriores, pudimos observar que manifiesta cierta actividad de unión inespecífica sobre el DNA de pC194*cop*. Por tanto, la capacidad de unión de la proteína RepB no se ve afectada por las mutaciones introducidas. Esto era predecible "a priori" por su comportamiento en la cromatografía de heparina-agarosa. Además, suponemos que el determinante de especificidad para la unión de RepB a los iterones, se encuentra en la región C-terminal de la proteína (ver Discusión).

24. LAS MUTACIONES Y99F E Y99S EN RepB NO SON RESCATABLES EN pLS1

Una pregunta básica era saber si los genes *repB* mutantes codificaban proteínas capaces de mantener su actividad de proteína iniciadora de la replicación de pLS1. Para responder a esta pregunta, se intentaron clonar en pLS1 las mutaciones mencionadas arriba y ensayar el posible establecimiento de los mutantes en *S.pneumoniae*. Los clonajes se realizaron mediante un intercambio de fragmentos *BglI-SspI* entre los plásmidos pALT7Y99F o pALT7Y99S (gen *repB* mutado) y pLS1. Se realizó una digestión doble del DNA de pLS1 con *BglI* y *SspI* (sitios únicos en las coordenadas 1934 y 2453, respectivamente), obteniéndose dos fragmentos de 519 y 3889 pb. Preparaciones de DNA plasmídico de pALT7Y99F y pALT7Y99S se digirieron con los mismos enzimas, obteniéndose en este caso fragmentos de 2494, 2319, 560, 519, 438,428, 408, 234, 120 y 24 pb. Las tres digestiones se cargaron en un

gel preparativo 1% agarosa y se realizó la extracción de los dos fragmentos de pLS1 y de la banda de 519 pb de los plásmidos mutantes (ya que dentro de este fragmento se encontraba la mutación previamente creada). A continuación, se realizó una ligación del fragmento grande de pLS1/*Bgl*II-*Ssp*I (3889 pb) con los fragmentos de 519 pb mutados y no mutados (reconstituyendo en este caso un pLS1 normal como control). Una vez conseguida la ligación de los fragmentos, se transformó un cultivo competente de *S.pneumoniae* y se seleccionaron los transformantes en medio sólido con Tc. Sólo se obtuvieron transformantes en el caso del pLS1 normal reconstituido (3.5×10^3 transformantes/ml). La transformación con los fragmentos mutados, se repitió dos veces más, pero no se obtuvieron transformantes.

Habría que señalar que, aunque la proteína RepBY99F presenta cierta actividad (corte/cierre) residual sobre oligonucleótidos en ensayos *in vitro*, ninguna de las dos proteínas mutantes (RepBY99F y RepBY99S) muestra actividad *in vitro* sobre DNA superenrollado, ni hemos podido obtener un sistema *in vivo* en el que estas proteínas mutantes sean funcionales. El hecho de no haber conseguido pasar las mutaciones introducidas en Tyr99 al replicón pLS1, nos sugiere que este residuo tiene un papel esencial en la actividad replicativa de RepB. Y como hemos comentado anteriormente, este residuo podría estar implicado en la unión covalente al DNA, ya que el grupo -OH de Tyr99 podría realizar el ataque nucleofílico sobre el enlace fosfodiéster del DNA.

DISCUSSION

1. ORIGEN DE REPLICACIÓN DEL PLÁSMIDO pLS1

El trabajo realizado en esta Tesis se ha centrado en el estudio de las interacciones que se producen entre la proteína iniciadora de la replicación del plásmido pLS1 (proteína RepB) y su origen de replicación de doble hebra (*dso*). Para pLS1, se ha podido delimitar *in vivo*, la región mínima que contiene un origen funcional necesario en *cis* para la replicación del plásmido, dentro de un fragmento de 247 pb (coordenadas 402-648), que comprende las Horquillas I y II, y las tres repeticiones directas (iterones), localizadas a 84 pb de distancia del sitio de corte de RepB (situado en el lazo monocatenario de H-I) (Fig. 74A). Asimismo hemos demostrado que, *in vitro*, la región mínima sensible a RepB puede reducirse a un fragmento de 181 pb (coordenadas 320-505) que contiene las Horquillas I y II. Sin embargo, esta región clonada por separado en un vector compatible con pLS1 no fue suficiente para mostrar incompatibilidad hacia pLS1, al igual que ocurrió cuando se clonó una región con los tres iterones del plásmido, a los cuales se une *in vitro* la proteína RepB. Por tanto, el *dso* se puede separar física y funcionalmente en dos regiones distintas: la región *bind*, que incluiría los tres iterones a los cuales se une *in vitro* la proteína RepB, y la región *nic*, donde la proteína introduce un corte en el DNA entre los nt G (448) y A (449) (de la Campa *et al*, 1990). Ambas regiones se encuentran separadas por 84 pb, y sólo la presencia de un *dso* entero de pLS1 en un replicón compatible, reveló una incompatibilidad débil hacia pLS1, como se espera para un origen funcional.

Al igual que en el caso de pLS1, el origen de replicación de la hebra(+) [*dso* u *ori*(+)] de los fagos filamentosos (f1, fd y M13) se encuentra situado en una región intergénica y posee una estructura bifuncional, que en este caso consta de un dominio A, que constituye el núcleo central o "core" del origen y un dominio B, formado por una secuencia adyacente rica en A+T (Fig. 74B). El dominio A o "core" de aproximadamente 45 nt está formado por los palíndromes D y E (Dotto *et al*, 1984) que contienen cuatro repeticiones de secuencia 5'-TGGAC-3' (α y β) o 5'-TGGAAC-3' (γ y δ) en direcciones alternas. Las repeticiones β , γ y δ constituyen el sitio de unión de la proteína gpII (Horiuchi, 1986; Greenstein y Horiuchi, 1987), mientras que la

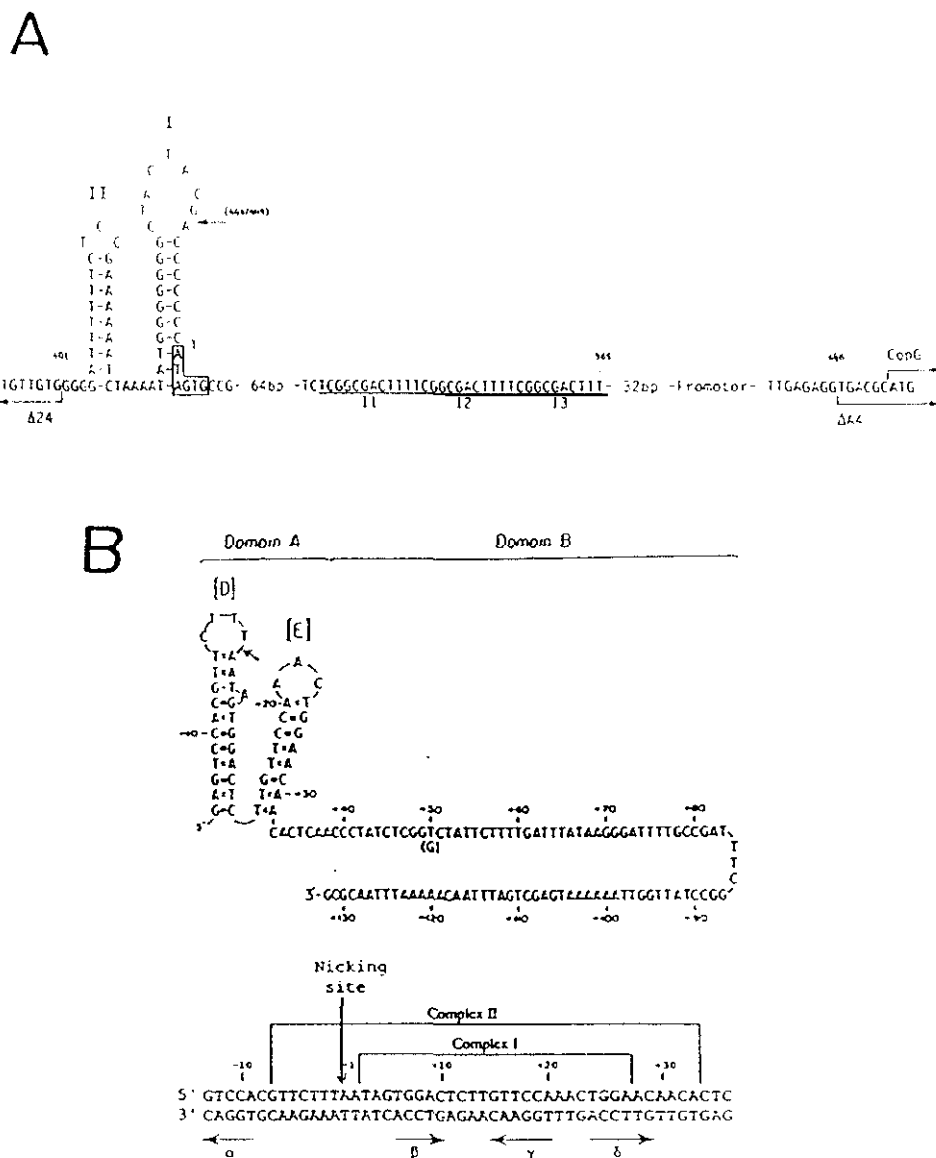


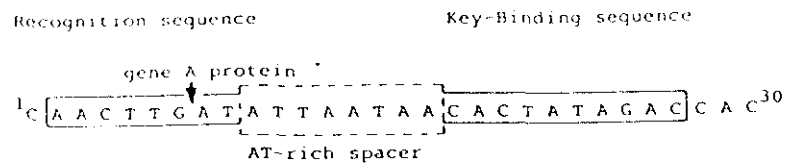
Figura 74. A. Secuencia y posibles estructuras secundarias del DNA de pLS1 en las que se localiza el *dso* del plásmido. Se indican los bordes de las deletiones $\Delta 24$ y $\Delta A4$ que delimitan el origen, las Horquillas I y II, los tres iterones (I1-I3), el codón de iniciación del gen *CopG* y el sitio de corte de la proteína *RepB* (448/449). En la base de la Horquilla I se muestra la secuencia consenso de orígenes y promotores de DNAs fágicos (caja; Kornberg y Baker, 1992) **B.** Panel superior: secuencia de nt de la región del origen(+) del fago f1. Se indica el sitio de corte de la proteína *gpII* (entre los nt 5780 y 5781) con una flecha y se define como posición 0. Se dibujaron dos horquillas para indicar las dos secuencias palindrómicas [D] y [E]. Según el autor (Horiuchi, 1986), esto no significa que tales estructuras se formen. Entre paréntesis se indica una sustitución de base encontrada en el fago M13. Se muestran las regiones correspondientes a los dominios A y B del origen. Panel inferior: secuencia correspondiente al dominio A o "core" del origen del bacteriófago f1. Con una flecha vertical se indica el sitio de corte de la proteína *gpII*. Dos corchetes muestran la secuencia de DNA protegida de la digestión con DNasa I por *gpII* en los complejos I y II. Mediante flechas horizontales se han señalado las secuencias repetidas α , β , γ y δ . Figura tomada de Higashitani *et al* (1994).

repetición α es necesaria para la terminación de la replicación aunque no para la iniciación (Dotto *et al*, 1982). El sitio de corte de la proteína gpII se sitúa en el lazo monocatenario del palíndrome D y se determinó entre los nt T (5781) y A (5782) (Meyer *et al*, 1979). El dominio B de aproximadamente 100 pb contiene tres sitios de unión para el factor de integración de huésped de *E.coli* (IHF; Greenstein *et al*, 1988) y constituye un activador o "enhancer" de la replicación, ya que potencia la replicación aproximadamente 100 veces (Dotto *et al*, 1984). Dentro de este grupo de fagos, habría que comentar que el fago filamentosos IKE (Peeters *et al*, 1985) que posee la misma organización genética de los fagos Ff y una gran conservación de secuencia dentro del dominio A del origen y de la proteína gpII, no presenta una secuencia de nucleótidos homóloga al dominio B, lo que sugiere que la replicación del DNA de IKE no requiere un "enhancer" de replicación (Peeters *et al*, 1986; Baas y Jansz, 1988).

El origen de replicación de los fagos isométricos (ϕ X174, G4) o de los plásmidos de la familia de pT181 se encuentra situado dentro de la región que codifica para la proteína iniciadora de la replicación (gen *A* o *repC*). La región del origen del fago ϕ X174 y relacionados está constituida por 30 nt conservados situados dentro del gen que codifica para la proteína GpA. El sitio de corte se localiza entre los nt G y A en las posiciones 7 y 8 de la región de origen (Langeveld *et al*, 1978) y se encuentra situado al comienzo de una región rica en A+T, con el palíndrome TATTAATA (Fig. 74C). Se ha demostrado que GpA es capaz de cortar un oligonucleótido sintético que contenga los primeros 10 nt de la región del origen (van Mansfeld *et al*, 1980). Sin embargo, para el corte de GpA sobre una molécula de DNA superenrollada (Heidekamp *et al*, 1981; Fluit *et al*, 1984) o sobre ssDNA en presencia de SSB (van Mansfeld *et al*, 1986) son suficientes y necesarios los primeros 27 nt de la región del origen. La región del origen de ϕ X174 y fagos relacionados se podría dividir en tres dominios: la secuencia de reconocimiento de la proteína GpA (nt 2-9), una región espaciadora rica en A+T que tolera algunas substituciones de nt (nt 10-17) y la secuencia clave de unión de GpA (nt 18-27) (Baas y Jansz, 1988).

A diferencia de lo que ocurre en pLS1, donde las regiones *bind* y *nic* del origen de replicación se encuentran separadas por unas docenas de pb, en pT181 o pC221, la región que contiene el sitio de corte de RepC o RepD y su sitio de unión son

C



D

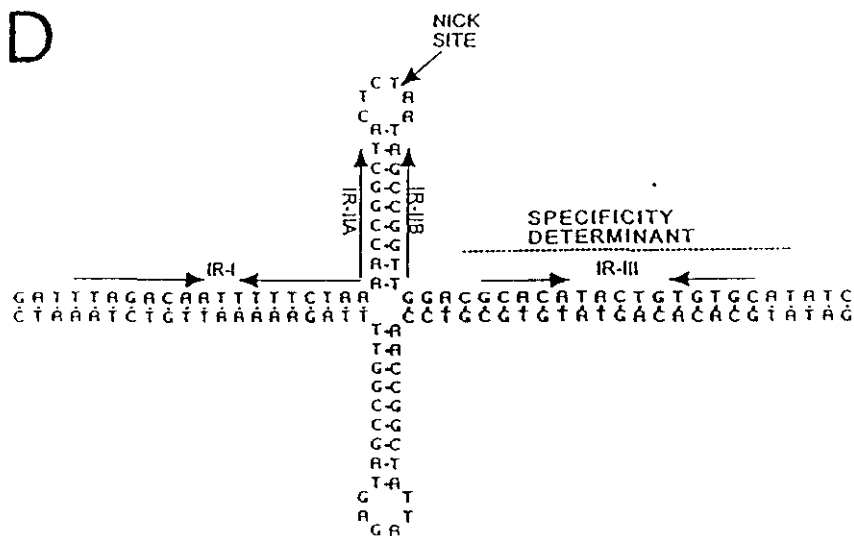


Figura 74. C. Origen de replicación del bacteriófago ϕ X174. Secuencia del DNA de ϕ X174 entre los nt 4299 y 4328, con sus diferentes dominios funcionales. La flecha indica la secuencia de corte de la proteína del gen A. El origen completo de 30 pb es necesario y suficiente para la replicación del DNA *in vivo* mediante círculo rodante y para el empaquetamiento del DNA. La terminación tiene lugar en los primeros 24 pb de la región del origen. Figura tomada de Baas y Jansz (1988). **D.** Estructura del *dso* del plásmido pT181. La región del origen contiene tres pares de repeticiones invertidas. IR-II está conservada entre los miembros de la familia de pT181, y contiene el sitio de corte de la proteína RepC ("nick site"), que se muestra en la configuración cruciforme. IR-III contiene el determinante de especificidad que varía entre los distintos plásmidos. La región protegida por RepC en los estudios de "footprinting" se indica en negrita. Figura tomada de Rasooly *et al* (1994a).

contiguas. El *dso* de ambos plásmidos, situado dentro de la secuencia que codifica para la proteína iniciadora, consta de tres pares de repeticiones invertidas (IR-I, IR-II e IR-III) (Fig. 74D; Gennaro *et al*, 1989). El sitio de corte de las proteínas RepC y RepD se ha localizado en la repetición IR-II, conservada entre todos los miembros

de la familia de pT181. Ambas proteínas introducen un corte entre los nt T y A (coordinadas 70/71 en pT181 y 1273/1274 en pC221; Koepsel *et al*, 1985; Thomas *et al*, 1990), situados en el lazo monocatenario de la estructura formada por IR-II. Los otros dos elementos (IR-I e IR-III) son diferentes entre los distintos miembros de la familia. La repetición IR-III constituye el determinante de especificidad de reconocimiento del origen por la proteína iniciadora de replicación (Wang *et al*, 1993); la función de IR-I es hasta el momento desconocida.

Una de las características más relevantes del *dso* de pLS1, respecto a otros plásmidos o bacteriófagos que poseen el mismo mecanismo de replicación RC, es la presencia de iterones en la región *bind* del origen. La presencia de iterones en el origen de replicación es típica de algunos plásmidos con replicación tipo theta (P1, F, RK2, etc). En estos casos, la unión de las proteínas Rep a los iterones junto con la unión de la proteína DnaA a sitios específicos del DNA, van a favorecer la apertura de la doble hélice en la región rica en A+T. La mayoría de las proteínas Rep de estos plásmidos, que presentan iterones tanto en la región del origen como en otras zonas más alejadas de éste, reprimen transcripcionalmente su propia síntesis mediante la unión a iterones e interacciones proteína-proteína, que al interaccionar entre sí pueden causar un impedimento estérico ("looping", Pal y Chattoraj, 1988; "handcuffing", McEachern *et al*, 1989) que bloquee la iniciación de la replicación. En el caso de pLS1, los iterones son el sitio de unión de RepB *in vitro* aunque, *in vitro*, la relajación de DNA superenrollado por RepB no requiere la unión previa de la proteína a esta región (Fig. 31). Hasta el momento, el papel de los iterones *in vivo* no está muy claro: se sabe que son esenciales para la replicación del plásmido, ya que tras la delección de los iterones no se obtuvo ningún transformante en *S.pneumoniae*. Sin embargo, se demostró que esta región clonada por separado en un replicón compatible no fue suficiente para mostrar incompatibilidad hacia pLS1. Nosotros pensamos que aquellas moléculas de RepB que se encuentren unidas a los iterones tendrán más ventajas para localizar y reconocer su sitio de corte en la Horquilla I, que la moléculas que no se hayan unido previamente (veáse más adelante). Por otro lado, la unión de RepB a los iterones podría ser un requisito para la generación de H-I, de un modo similar a lo que ocurre en pT181, donde se ha demostrado que RepC promueve la extrusión del elemento cruciforme IR-II (Noirot *et al*, 1990).

El hecho de que hasta el momento no se haya podido conducir replicación de plásmidos recombinantes que lleven clonado el *dso* de pLS1, suministrando RepB en *trans*, sugiere la posibilidad de que existan otras secuencias de DNA alejadas del origen, que puedan influir en *cis* en la función normal del *dso* en el proceso replicativo. A diferencia de lo que ocurre en los fagos filamentosos (Dotto *et al*, 1984) y en el plásmido pKYM (Yasukawa *et al*, 1994), que poseen un "enhancer" de replicación dentro de la región del origen, en pT181 se ha determinado un elemento de secuencia llamado *cmp* que actúa en *cis* y se encuentra situado aproximadamente a 1 kpb del origen (Gennaro y Novick, 1986). Los autores (Gennaro y Novick, 1988) proponen que el elemento *cmp* actúa en el paso de iniciación, estimulando directamente la función del origen y afectando exclusivamente a la eficiencia de unión iniciador-origen, sin modular la expresión de la proteína iniciadora RepC. Otra explicación para el hecho de no poder conducir replicación de plásmidos recombinantes que contengan el *dso* de pLS1, podría ser que en estos plásmidos no se extruya la Horquilla I. Otros intentos realizados para conducir replicación de pFX2, suministrando en *trans* la proteína RepB de pLS1 o en la situación inversa, conducir replicación de pLS1 suministrando en *trans* la proteína RepX de pFX2, también resultaron fallidos. Esto nos dirige otra vez a la hipótesis de la existencia de algún "enhancer" de replicación o de un requerimiento específico de la proteína Rep de cada plásmido que estimule la replicación. Por supuesto, no se puede descartar que las pequeñas diferencias entre los iterones de pLS1 (5'-TCGGCGACTTT-3') y pFX2 (5'-TCGCCAACGTTT-3') no sean la causa del fallo en la conducción de la replicación de ambos plásmidos. En los ensayos de incompatibilidad *in vivo*, cuando ambos plásmidos se encontraban en una misma célula, el plásmido menos favorecido (en términos de reducción del número de copias o pérdida plasmídica) siempre resultó ser pLS1. Una explicación, aunque meramente especulativa, sería pensar que pLS1 carece de un locus *cmp*⁻ (empleando el término de pT181) y por tanto estaría en desventaja frente a un plásmido *cmp*⁺. Aunque la delección del fragmento *EcoRI* B que existe en pLS1 no influye en sus características replicativas (del Solar *et al*, 1987a), si suponemos que en este fragmento se encuentra el elemento "cmp" (por ejemplo, dentro del gen *mob*), sería interesante conocer qué ocurre cuando se encuentran en una misma célula el plásmido pLS1 y su parental, pMV158. También habría que considerar que la estabilidad y frecuencia en la generación de la estructura

cruciforme del *dso*, podría estar favoreciendo especialmente a pFX2 en la utilización de ambas proteínas de replicación. Un dato sería que el valor calculado para la energía libre de la estructura del *dso* de pFX2 es más negativo ($\Delta G = -37.8$ kcal), y por tanto, más favorable a su formación, que el obtenido para H-I de pLS1 ($\Delta G = -29.8$ kcal) (los cálculos se realizaron para RNAs de secuencia equivalente al *dso* según Tinoco *et al*, 1973).

La distribución y frecuencia de nucleótidos que rodean la región *nic* del *dso* de pLS1 (Fig. 75) nos muestra la presencia de una secuencia rica en G+C alrededor del sitio de corte por RepB (nt 448/449), flanqueada por secuencias ricas en A+T. Se ha considerado que este tipo de distribución es importante en la generación de estructuras cruciformes (Bowater *et al*, 1991), y sobre DNA superenrollado de pLS1 se ha mapeado una estructura cruciforme en esta zona, la Horquilla I, mediante sensibilidad a nucleasa S1 (Puyet *et al*, 1988). La presencia de este tipo de estructuras cruciformes en el origen de replicación se ha determinado *in vivo* e *in vitro* para pT181 (Noirot *et al*, 1990) y en base a datos genéticos, se ha propuesto su existencia en la región *nic* de pC194 (Michel y Ehrlich, 1986). Sin embargo, este tipo de estructuras cruciformes no parecen requerirse para la iniciación de la replicación de pUB110 (Alonso *et al*, 1988). Como ya se ha indicado, el sitio de corte de la proteína GpA del fago ϕ X174 se encuentra situado junto a una región rica en A+T, pero no forma parte de ninguna estructura secundaria. Se ha demostrado que el DNA superenrollado contiene regiones de desnaturalización local, particularmente en zonas ricas en A+T (Jacob *et al*, 1974), lo cual facilitaría la entrada de GpA al origen de ϕ X174. En el caso de los fagos filamentosos Ff, existen dos posibles estructuras secundarias, palíndromes D y E, dentro del dominio A del origen, aunque esto no significa que se formen necesariamente. El hecho de que la repetición α , que se encuentra en el posible tallo del palíndromo D, no sea necesaria para la iniciación de la replicación aunque sí en la terminación (Dotto *et al*, 1982) podría indicar que la generación del palíndromo D no es necesaria para la iniciación de la replicación de los fagos Ff.

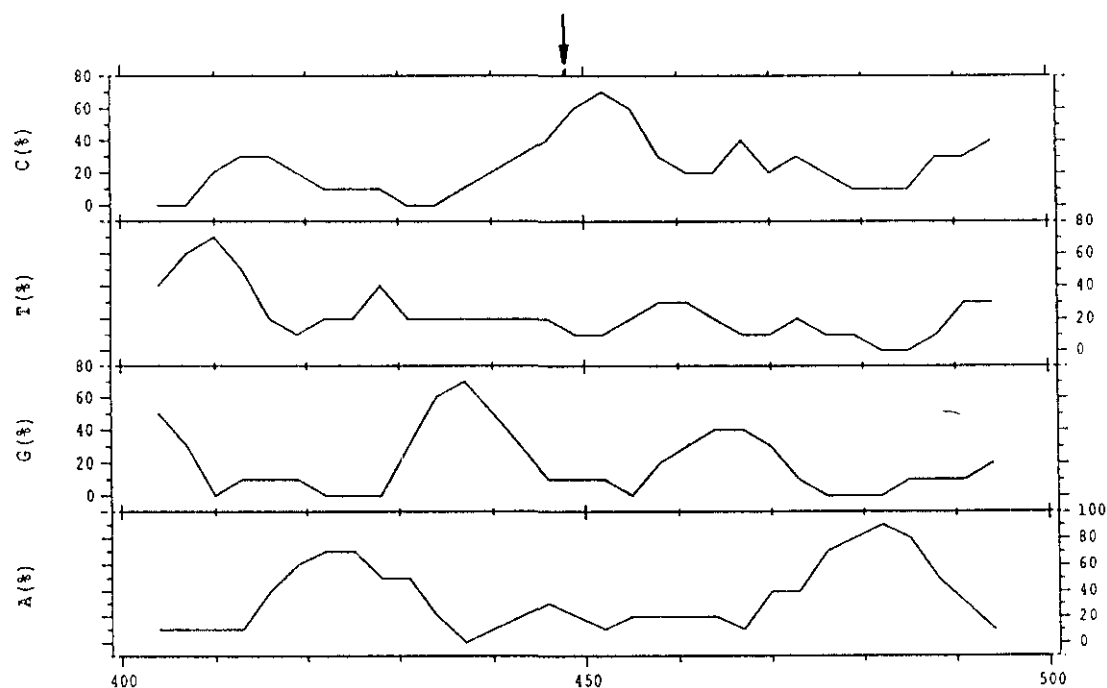


Figura 75. Distribución de la frecuencia de nucleótidos en el *dso* de pLS1 entre las coordenadas 400 y 500. Se observa que el sitio de corte de la proteína RepB (flecha) se encuentra situado dentro de una región central rica en G+C, que está flanqueada por secuencias con un alto contenido en A y T.

En la secuencia que constituye el *dso* de pLS1, predicciones por ordenador, muestran la presencia de dos centros de curvatura en esta región hacia las coordenadas 415-420 y 565 (Fig. 76), localizadas "corriente arriba" de H-I y "corriente abajo" de los iterones. Mediante ensayos de retardo en gel y de permutación circular (Pérez-Martín *et al*, 1988), se ha determinado la existencia de una curvatura intrínseca compleja en el DNA de esta región que podría acercar ambas regiones del origen, facilitando la actuación de RepB, unida a los iterones, sobre su sitio de corte. La existencia de dos curvaturas intrínsecas, cuyos centros de curvatura se localizarían alrededor de las coordenadas 380 y 460-470 ("corriente arriba" de H-I y en la secuencia comprendida entre H-I y los iterones, respectivamente; Fig. 35), se encuentra avalada por la presencia de series (A-T)_n con una periodicidad aproximada de 10 pb y la característica distribución de bandas de hipersensibilidad a DNasa I y el patrón de "footprinting" con el radical hidroxilo (de la Campa *et al*, 1990). Las curvaturas en el DNA pueden constituir sitios de reconocimiento para las proteínas

de replicación en el origen, como ocurre en el fago λ y el virus SV40 (Zahn y Battner, 1985a; Ryder *et al*, 1986); o pueden ser inducidas o incrementadas por la unión de las proteínas de replicación al origen, como ocurre en el plásmido R6K (Mukherjee *et al*, 1985) o en el fago λ (Zahn y Blattner, 1985b). Para pT181 se mostró la existencia de una curvatura intrínseca en el origen de replicación, que se veía incrementada tras la unión la proteína RepC al origen (Koepsel y Khan, 1986). Debido a que esta curvatura se presenta de forma inusual dentro de un segmento rico en G+C, los mismos autores indican que otra posible explicación sería la formación de una estructura cruciforme dentro del origen, ya que se ha comprobado que este tipo de estructuras manifiesta una movilidad electroforética anómala similar a una curvatura (Gough y Lilley, 1985). Sin embargo, estructuras cruciformes no se forman en DNA lineal. Posteriormente, se ha comprobado la existencia, tanto *in vivo* como *in vitro*, de estructuras cruciformes en el *dso* de pT181, cuya extrusión se ve favorecida por la unión de la proteína RepC (Noirot *et al*, 1990).

El estudio de la organización genómica de plásmidos que replican mediante RC, ha puesto de manifiesto que la mayoría de los orígenes de replicación de estos plásmidos se encuentra situado entre unidades de transcripción divergentes y en algún caso entre unidades paralelas, pero nunca entre unidades convergentes (Novick, 1989). Como se ha sugerido (Liu y Wang, 1987) que entre unidades de transcripción divergentes se acumulan vueltas de superenrollamiento negativo, un exceso de tensión superhelicoidal negativa podría incrementar la función de un origen situado entre promotores divergentes y por el contrario, un exceso de tensión superhelicoidal positiva sería inhibitorio (Novick, 1989). En el caso de pLS1, el *dso* se encuentra situado entre dos promotores divergentes: P_{cr} , a partir del cual se transcribe el operón *cop-rep* y P_i , localizado "corriente arriba" del *dso* y a partir del cual se transcribe el RNA I. Pensamos que las ondas de transcripción podrían producir una tensión torsional suficiente sobre el *dso* para facilitar la generación de la Horquilla I.

Una última característica que podemos señalar sobre el *dso* de pLS1, es la presencia de la secuencia consenso de orígenes y promotores de DNAs fágicos (5'-ATAGTG-3'; Kornberg y Baker, 1992) en la base de la estructura tallo-lazo que forma H-I (Fig. 74A). No se conoce si este hecho posee alguna importancia evolutiva

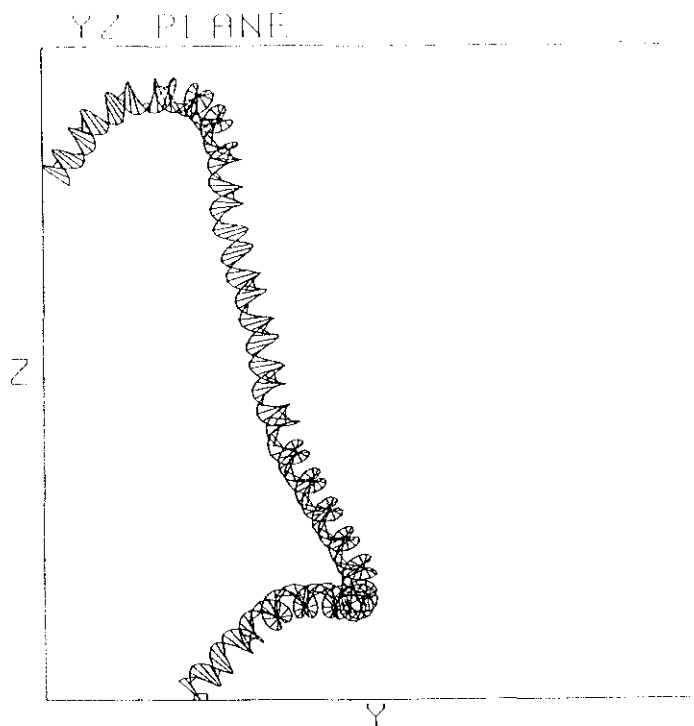


Figura 76. Predicción por ordenador de las curvaturas intrínsecas presentes en la región del *dso* de pLS1, entre las coordenadas 350 y 607. La caja pequeña indica la posición de la coordenada 350.

que pueda relacionar al pLS1 con los colifagos de ssDNA, o corresponde simplemente a una similitud producida al azar. Hay que señalar además, que no se han encontrado homologías significativas entre el *dso* de pLS1 y los bacteriófagos M13 o ϕ X174, o con otras familias de plásmidos RC.

2. RepB, PROTEÍNA INICIADORA DE LA REPLICACIÓN DE pLS1

Previamente, se había demostrado que RepB poseía actividades de topoisomerasa tipo I-5' y de endonucleasa específica de sitio (de la Campa *et al*, 1990). En el presente trabajo se ha realizado un estudio más detallado de los requerimientos de la proteína RepB en sus actividades de corte/cierre y de transferencia de hebra.

RepB, como correspondería lógicamente a una proteína iniciadora de la replicación por el mecanismo RC, es capaz de actuar en *trans*, como se comprobó en ensayos de complementación *in vivo* con dos derivados de pLS1 que carecen de un gen *repB* funcional, pJS4 (del Solar *et al*, 1993b) y pLS1ΔA15. Existen otras proteínas Rep que, *in vivo*, parecen actuar primariamente en *cis*, como ocurre con las proteínas RepA del plásmido R1 (Kollek *et al*, 1980) y GpA de φX174 (Tessman, 1966). Sin embargo, se ha demostrado que las proteínas RepC y RepF de los plásmidos pT181 y pE194, respectivamente, son activas en *trans* (Gennaro *et al*, 1989; Sozhamannan *et al*, 1990).

Mediante ensayos de equilibrio de sedimentación se pudo determinar la masa molecular de RepB, que se corresponde aproximadamente a la de un hexámero. Sin embargo, las proteínas Rep de los plásmidos de la familia de pT181 son homodímeros en solución (Thomas *et al*, 1990; Rasooly *et al*, 1994b). Las dos proteínas Rep de los plásmidos de la familia de pC194 que han sido purificadas son monómeros en solución; la proteína RepK codificada por el plásmido pKYM también se une al *dso* como monómero (Ozaki *et al*, 1994), pero en el caso de pUB110 se requieren aproximadamente seis protómeros del heterodímero RepU-RepU* (donde RepU* es la subunidad inactiva) para la unión al *dso* (Müller *et al*, 1995).

Una característica diferencial del gen *repB* de pLS1, es que no se encuentra precedido por una secuencia Shine-Dalgarno, sino por un sitio atípico de unión a los ribosomas (secuencia a.r.b.s., 5'-ATTTCT-4 ó 5 nt-TATA-9 ó 10 nt-ATG-3'; Lacks *et al*, 1986), que también se ha encontrado entre otros, en el gen estructural de la DNA metilasa *DpnII* de *S.pneumoniae* (Mannarelli *et al*, 1985). Sin embargo, los plásmidos de la familia de pT181 (Projan y Novick, 1988) y la mayoría de los plásmidos pertenecientes a la familia de pLS1, con la excepción de pE194 y pADB201 (Villafane *et al*, 1987; Bergemann *et al*, 1989), presentan una secuencia Shine-Dalgarno precediendo al gen *rep*. Hay que señalar que en el gen *repB* existe un segundo codón ATG en la coordenada 949 de pLS1, precedida en este caso por una posible secuencia Shine-Dalgarno (5'-GGAGTG-3'; de la Campa *et al*, 1990). A partir de este segundo codón ATG se podría sintetizar un polipéptido RepB*, de forma similar a lo que ocurre con la proteína GpA* de φX174 (Colasanti y Denhardt, 1987). La proteína

RepB* se pudo expresar en *E.coli*, empleando el plásmido pLS19ΔN, como una proteína de aproximadamente 20 kDa, resultado de la delección de los primeros 32 codones del gen *repB* de pLS1. La expresión se realizó utilizando la putativa secuencia Shine-Dalgarno de pLS1, ya que el clonaje se hizo en un vector que no contenía ninguna posible secuencia Shine-Dalgarno precediendo la secuencia de pLS1. Sin embargo, pudimos comprobar que, por lo menos en *S.pneumoniae*, esta putativa RepB* no fue suficiente para conducir *in vivo* la replicación del plásmido pLS1ΔA15, que carecía del primer codón ATG del gen *repB* (del Solar *et al*, 1993b). Como ya hemos demostrado, este plásmido sólo se pudo establecer en *S.pneumoniae* cuando se le suministró en *trans* la proteína RepB codificada por el plásmido pLS1 (de la Campa *et al*, 1990; del Solar *et al*, 1993b). En el caso de φX174, la proteína GpA* corta el ssDNA de φX174 preferentemente en el origen de replicación (Langeveld *et al*, 1979), y al igual que GpA, se une covalentemente al extremo 5' del DNA en el sitio de corte (van Mansfeld *et al*, 1980) y posee actividad de cierre (Eisenberg y Finer, 1980). Sin embargo, GpA* no puede producir una desnaturalización parcial del origen en la iniciación de la replicación (van Mansfeld *et al*, 1980), y no es esencial para la reproducción de φX174 (Baas *et al*, 1987). Además, inhibe la replicación del DNA de *E.coli*, con lo cual moviliza los factores de replicación del huésped para la replicación del fago y puede estar implicada en un cambio eficiente del estadio de replicación II (reproducción del DNA viral) al III (encapsidación y liberación de las partículas virales) (Baas *et al*, 1987; Colasanti y Denhardt, 1987). En el gen *repU* del plásmido pUB110 también se han descrito dos residuos de Met precedidos de secuencias Shine-Dalgarno, pero se ha comprobado que la proteína RepU se traduce sólo a partir de la primera Met del gen *repU* (Maciag *et al*, 1988).

Entre las proteínas Rep de los plásmidos RC no se han encontrado motivos típicos de unión a DNA, aunque en la proteína RepB de pLS1 sí se ha descrito un putativo motivo de cremallera de leucinas (LZ) (Fig. 77; de la Campa *et al*, 1990):

S₇₀VRKKIKL₇₇LLGEKSL₈₄AMVQVVL₉₁NVENMYL₉₈YLTHES

El motivo LZ se ha descrito como un motivo de dimerización de varios factores de transcripción eucarióticos (Landschultz *et al*, 1988) y se caracteriza por una repetición de 4-5 leucinas cada 7 residuos, de tal forma que las Leu se alinean en una cara común cada segunda vuelta de 4/3 de α-hélice. Por lo general, este motivo lleva

Figura 77. Posible motivo de Leu-zipper presente en la proteína RepB de pLS1. Proyección del motivo LZ a lo largo del eje de la α -hélice, se indica la posición de los residuos de Leu en la estructura, tomando como posición 1 a la primera Leu del motivo LZ.

Comparando la secuencia completa de aa de RepB con secuencias de proteínas presentes en el Banco de Datos P.I.R., sólo se encontró una homología baja, aproximadamente un 20% de identidad, con la proteína P3 del fago ϕ 29, la proteína de replicación del DNA del fago T4, la DNA polimerasa del fago SPO2 y la DNA primasa de *Salmonella typhimurium*. Tampoco se observó una homología significativa con las proteínas Rep de otras familias de plásmidos RC o con las proteínas iniciadoras de ϕ X174 o M13. Como se ha comentado previamente, Ilyina y Koonin (1992) han establecido la existencia de tres motivos conservados entre las proteínas Rep iniciadoras de la replicación y las proteínas Mob, implicadas en la transferencia conjugativa del DNA. Las proteínas Rep de los plásmidos de la familia de pT181 presentan una región central conservada, donde se ha localizado la Tyr implicada en la unión covalente al DNA (Thomas *et al*, 1990) y una región divergente en el extremo C-terminal, donde se ha localizado el determinante de especificidad de unión al *dso* (Wang *et al*, 1992; Dempsey *et al*, 1992; Thomas *et al*, 1995). En la familia de pLS1, como se discutirá más adelante, se han encontrado motivos de aa conservados en las regiones N-terminal y central, y un mayor grado de divergencia en la región C-terminal, lo cual nos hace suponer que la región N-terminal estaría implicada en las actividades de corte/cierre y el extremo C-terminal en el reconocimiento de los iterones (del Solar *et al*, 1993c).

Tanto en este trabajo como en estudios previos (de la Campa *et al*, 1990) se ha demostrado que la actividad de corte/cierre o topoisomerasa tipo I-5' de RepB, aunque no la de unión a la región *bind*, es dependiente de la presencia de Mn^{2+} en la reacción. La concentración óptima de Mn^{2+} se estableció en 20 mM y no se obtuvo ninguna actividad detectable de la proteína en presencia de otros cationes. Pudimos comprobar que la actividad de cierre de RepB se inhibe en presencia de 250-300 mM KCl en el tampón de reacción. Nosotros pensamos que el Mn^{2+} contribuye a la estabilidad de la proteína frente al calor, facilitando una disgregación proteica o produciendo un cambio conformacional en la proteína, al unirse a su centro activo. Para la proteína RepD de pC221, se ha postulado que los iones Mg^{2+} podrían estabilizar la forma dimérica de la proteína, modulando su interacción con el origen y por tanto, la eficiencia de replicación (Thomas *et al*, 1995). Conviene recordar que el motivo 2 de las proteínas Rep (XpH \overline{U} HuUUX, donde U representa un residuo

hidrofóbico y X, cualquier residuo) descrito por Ilyina y Koonin (1992), que se corresponde con el motivo KKAHYHVLV de la región R-III de RepB, podría estar implicado en la coordinación de iones metálicos. No obstante, conviene considerar la existencia del motivo "DKD" en la región R-II de RepB, que podría ser similar al motivo "DTD" (dos Asp juntos o separados por un residuo) presente en la región II de la proteína TraI y que supuestamente estaría implicado en la coordinación de iones metálicos, concretamente, se ha descrito como motivo de unión a Mg^{2+} (Argos, 1988; Pansegrau *et al*, 1994). Las proteínas Rep de los plásmidos pT181 y pC221 requieren Mg^{2+} para su actividad y se ha comprobado que en estas proteínas, el Ba^{2+} permite el corte, pero no el mantenimiento de un enlace covalente estable ni la religación (Koepsel *et al*, 1985; Thomas *et al*, 1990). En el caso de la proteína gpII del fago fd, los cationes divalentes Ca^{2+} y Ba^{2+} inhiben la actividad de cierre de moléculas FI previamente cortadas por la proteína, y curiosamente, el Mn^{2+} extiende la reacción de corte de gpII a las dos hebras del DNA fágico, obteniéndose como producto DNA lineal (Meyer y Geider, 1979).

Es un hecho comprobado que para la replicación RC del DNA plasmídico o fágico se requiere preferentemente un sustrato de DNA negativamente superenrollado (Marians *et al*, 1977; Meyer y Geider, 1979; Noirot *et al*, 1990), lo cual también se ha demostrado para pLS1 en ensayos de replicación *in vitro* (del Solar *et al*, 1987a). Sin embargo, los requerimientos de sustrato para las actividades de unión y corte/cierre varían entre las distintas proteínas Rep. Según hemos comprobado, RepB actúa sobre DNA plasmídico superenrollado (formas FI, donde como veremos más adelante, es importante el grado de superenrollamiento) y es capaz de cortar, unir e intercambiar entre sí, oligonucleótidos monocatenarios. Sin embargo, RepB no presenta actividad endonucleásica detectable sobre dsDNA lineal y DNA circular relajado (formas FI'). Mediante ensayos de retardo en gel, hemos comprobado la unión de RepB a los tres iterones del origen sobre dsDNA lineal, observando la aparición de varios complejos proteína-DNA (Fig. 71), cuya significación no se ha analizado con detalle. Sin embargo, no hemos observado unión de RepB a un oligonucleótido monocatenario que contenga la región *nic*, aunque en presencia de SSB, RepB sí mantiene su actividad de corte (Fig. 47). La proteína RepC de pT181 posee actividad de corte, *in vitro*, sobre dsDNA (superenrollado o lineal) o sobre ssDNA (Koepsel y Khan, 1987).

En este último caso, RepC introduce cortes en otros sitios secundarios pero, en presencia de SSB, los sitios secundarios (y no el sitio específico en el *dso*) son protegidos del corte por RepC (Koepsel y Khan, 1987). Aunque se sugirió que las formas relajadas del DNA de pT181 podrían ser sustrato de replicación en ensayos *in vitro* (Khan *et al*, 1981), posteriormente se ha postulado que la unión de la proteína RepC al origen favorece la formación de una estructura cruciforme sobre DNA superenrollado, esencial para la replicación del DNA de pT181 (Noirot *et al*, 1990).

Hemos comprobado que la proteína RepB, *in vitro*, puede relajar DNA superenrollado o cortar oligonucleótidos monocatenarios que no contienen la región *bind* del origen de pLS1. Por tanto, la actividad de corte de RepB *in vitro* no requiere una unión previa a los iterones del origen. Sin embargo, usando oligonucleótidos sintéticos como sustrato, se ha comprobado que la proteína gpII del fago f1 requiere la presencia de su región de unión en forma bicatenaria y su sitio de corte como ssDNA, para que se lleve a cabo una reacción eficiente de corte (Higashitani *et al*, 1994). Nosotros hemos comprobado que la actividad de corte de RepB es dependiente de hebra y sitio, pero es independiente de orientación sobre DNA superenrollado (Fig. 31). Sin embargo, hemos demostrado que la posición relativa de los iterones y el sitio de corte de RepB en una misma cara de la hélice del DNA, es importante para la iniciación de la replicación *in vivo*.

Realizando ensayos de actividad sobre oligonucleótidos monocatenarios que contenían la región *nic* de pLS1, comprobamos la especificidad de secuencia y que no se necesita la formación de apareamientos intracatenarios. Estos datos, sumados al requerimiento de DNA específico superenrollado para la replicación de pLS1 (del Solar *et al*, 1987a) y a la dependencia del grado de superenrollamiento en la actividad de RepB (Fig. 61; Moscoso *et al*, 1995b), nos indican que la generación de estructuras secundarias en el origen de pLS1 (o sea, la extrusión de la Horquilla I) tiene como objetivo la exposición del sitio de corte en configuración monocatenaria, esencial para la actividad de corte de RepB (Moscoso *et al*, 1995a).

La actividad de RepB sobre DNA superenrollado y ssDNA es dependiente de la concentración de proteína y de la temperatura de reacción. RepB no presenta

actividad a temperaturas inferiores a 30°C y, aunque a temperaturas superiores y cantidades crecientes de proteína, hemos observado un aumento progresivo de los productos FII + FI' generados por RepB, la reacción tendía a saturarse a concentraciones de proteína alrededor de 40 ng. La máxima actividad de RepB, medida como porcentaje de formas FII + FI' obtenidas, se obtuvo a los 60°C, aunque se observó que los mayores porcentajes de formas FI' (productos de corte/cierre) respecto a las formas FII (productos de corte) se obtuvieron a 45°C (Moscoso *et al*, 1995b). Como la generación de estructuras cruciformes depende en gran medida de la temperatura (Bowater *et al*, 1991), las diferencias de actividad observadas podrían deberse al hecho de que a una temperatura dada sólo una fracción determinada de las moléculas de DNA plasmídico tienen expuesta la Horquilla I y esta fracción se incrementa con la temperatura de reacción, con lo cual el porcentaje de moléculas potencialmente sensibles a RepB es mayor (Moscoso *et al*, 1995b). Además, debemos considerar el hecho de que RepB presenta una actividad de corte, ligeramente mayor a 60°C que a 37°C, sobre oligos monocatenarios que carecen de posibles apareamientos intracatenarios. Esto nos podría indicar que la mayor actividad de RepB a 60°C, se debe a una resolución de agregados proteicos a esta temperatura, que puede condicionar el porcentaje de moléculas de RepB potencialmente activas. En pT181 se ha observado un incremento de extrusión cruciforme en el origen y un aumento de la eficiencia en el uso del origen *in vivo*, al eliminar las estructuras secundarias del plásmido que pudiesen competir con la formación de la estructura cruciforme en el origen (Noirot *et al*, 1990). Mediante ensayos de sensibilidad a nucleasa S1, en el plásmido pLS1 se han localizado cuatro estructuras secundarias (Puyet *et al*, 1988): las Horquillas I y II dentro de la región *nic* del origen, la Horquilla III, mayoritaria a 37°C y que se encuentra en la región que corresponde al putativo terminador del RNA I, y la Horquilla IV, que está localizada dentro del origen de replicación de la hebra complementaria (*ssbA*). La eliminación de la Horquilla III (posible competidor de la Horquilla I) en los plásmidos pLS5 y pLS1Δ24*cop7*, o de las Horquillas III y IV en el plásmido pLS4, no reflejó un incremento en la actividad de la proteína iniciadora. Las diferencias observadas en la actividad de RepB sobre los derivados de pMV158 podrían deberse a diferencias en la distribución de topoisómeros y en el grado de superenrollamiento de los distintos derivados (Fig. 42), ya que se sabe que las formaciones cruciformes son

estructuras dinámicas y transitorias que dependen fundamentalmente del nivel de superhelicidad negativa del DNA plasmídico (Lilley, 1985). Modulando, *in vitro*, el grado de superenrollamiento del DNA plasmídico de pLS1 y pE194, pudimos comprobar que la actividad de RepB sobre DNA superenrollado, depende del grado de superhelicidad negativa del sustrato (Fig. 61), probablemente por la generación o no de la estructura cruciforme del origen (Moscoso *et al*, 1995b). Para la proteína gpII de los fagos filamentosos (f1, M13 y fd) se ha demostrado que la substitución de un único aa de la proteína (Gly73→Ala) reduce sensiblemente el requerimiento de superhelicidad del DNA sustrato (Higashitani *et al*, 1992).

Mediante el uso de oligonucleótidos sintéticos hemos determinado la diana de RepB dentro de la secuencia consenso de 9 nt: 5'-TACTACR/HC-3', donde R es una base púrica y H, cualquier residuo y (/) indica en sitio de corte de la proteína. En el caso de la proteína RepD de pC221, que introduce un corte entre los nt T (1273) y A (1274) (Thomas *et al*, 1990), se ha comprobado que la substitución de la T situada a 5' del sitio de corte reduce considerablemente la eficiencia de corte. Aunque el sitio de corte de RepB de pLS1 se determinó entre los nt G (448) y A (449) (de la Campa *et al*, 1990) como ocurre en GpA del bacteriófago ϕ X174 [sitio de corte entre G (4305) y A (4306); Langeveld *et al*, 1978], no existe una homología significativa entre sus orígenes o en las proteínas de replicación. Sin embargo, entre ϕ X174 y pC194 sí se ha establecido una relación entre sus proteínas Rep y la secuencia que rodea su sitios de corte (van Mansfeld *et al*, 1986; Gruss y Ehrlich, 1989). La secuencia situada a 5' del sitio de corte de RepB (5'-TACTACG-3') es necesaria para la actividad de cierre y nucleotidiltransferasa de la proteína, lo cual podría ser un primer indicio sobre el papel de la proteína RepB y la secuencia del origen de pLS1 en la terminación de la replicación. Asimismo pudimos comprobar que RepB era capaz de unir el extremo 5'-fosfato, generado como producto de la reacción de corte, con un extremo 3'-OH nuevo, aunque fallaba en la situación inversa. Esto nos indica que el extremo 5'-fosfato es "activado" de alguna forma por la proteína, activación que puede suponer un cambio conformacional de la proteína para conservar la energía para cerrar el corte (Moscoso *et al*, 1995a).

3. INICIACIÓN Y TERMINACIÓN DE LA REPLICACIÓN MEDIANTE CÍRCULO RODANTE

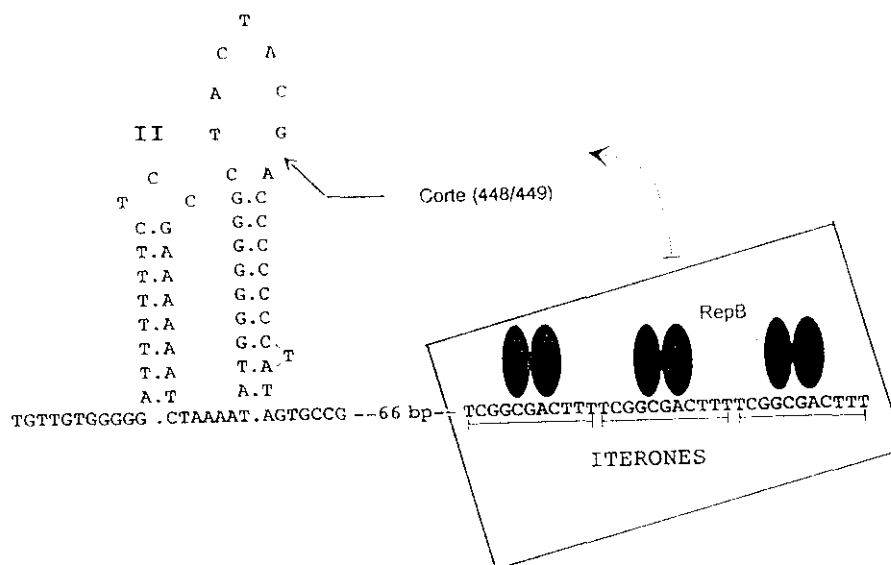
Una de las diferencias más relevantes entre el mecanismo de replicación tipo theta y la replicación RC, consiste en la necesidad por parte del primer grupo de sintetizar un RNA cebador o "primer" que proporcione el grupo 3'-OH libre para que comience la síntesis del DNA. En la replicación RC la situación es más simple, ya que la encargada de proporcionar un extremo 3'-OH libre va a ser una proteína codificada por el plásmido o colifago, capaz de introducir un corte específico dentro del origen de replicación en la forma superenrollada del DNA. Una vez que se ha generado el extremo 3'-OH libre, una helicasa codificada por el huésped podría ir desplazando la cadena(+) parental, que sería protegida por moléculas de la proteína SSB, y posiblemente la DNA polimerasa III sería la encargada de ir extendiendo el 3'-OH, usando como molde la hebra(-) del plásmido (Novick, 1989). Por tanto, la hebra parental desplazada y la cadena nueva que está siendo sintetizada quedarían unidas covalentemente como una única molécula de DNA en las primeras etapas de la replicación, como ocurre en el fago fd (Meyer y Geider, 1982).

El paso clave en la iniciación de la replicación es el reconocimiento del origen por parte de la proteína iniciadora y la apertura de las hebras del DNA en esta zona. Como hemos visto anteriormente, la generación de estructuras cruciformes en el origen es uno de los mecanismos adoptados por los plásmidos RC para exponer el sitio de corte de la proteína Rep en configuración monocatenaria. Sin embargo, en el *ori*(+) del bacteriófago ϕ X174 no se encuentran estructuras secundarias y, la proteína GpA participa junto con la *rep*-helicasa de *E.coli* en el desenrollamiento de la hélice del DNA al inicio de la horquilla de replicación (Baas y Jansz, 1988). Por otro lado, en el fago f1 se ha comprobado que la formación de una hipotética estructura cruciforme entre las repeticiones invertidas α y β no es un pre-requisito para la iniciación de la replicación (Higashitani *et al*, 1994). La unión de la proteína gpII a las repeticiones β , γ y δ (Greenstein y Horiuchi, 1987) induce una curvatura de la región del origen, seguida de la fusión del dúplex de DNA (Higashitani *et al*, 1994), con lo cual el sitio de corte queda en configuración monocatenaria y la proteína gpII puede introducir un corte específico en el origen de replicación (Meyer

et al, 1979). En pT181 sí se ha comprobado que la estructura cruciforme IR-II del origen se forma tanto *in vivo* como *in vitro*, y que la unión de la proteína RepC al origen incrementa su extrusión (Noirot *et al*, 1990). La unión se realiza de forma asimétrica (Fig. 4), uno de los dímeros de RepC se une al brazo derecho de IR-III; el otro dímero cubre el brazo izquierdo y la región central de IR-III y el lado derecho de IR-II, introduciendo un corte en la hebra del DNA y uniéndose covalentemente al extremo 5'-fosfato (Wang *et al*, 1992, 1993). Los autores sugieren que el segmento central de IR-III podría servir para posicionar adecuadamente la región IR-II respecto al brazo izquierdo de IR-III para conseguir una interacción óptima con la proteína (Wang *et al*, 1992). Además, proponen la existencia de dos dominios separados de unión al DNA, el determinante de especificidad constituido por seis residuos de la región C-terminal y un segundo dominio de unión, localizado presumiblemente en una región adyacente al residuo Tyr del sitio activo (Wang *et al*, 1993); ambos dominios podrían plegarse para generar el centro catalítico de la proteína. Basándonos en los datos que hemos obtenido para pLS1, pensamos que la iniciación de la replicación *in vivo* podría seguir la siguiente serie de acontecimientos: la unión de RepB a los iterones podría ser un requisito previo para la generación de la Horquilla I y para que el DNA adopte la configuración espacial adecuada para facilitar la accesibilidad de RepB al sitio de corte en la región monocatenaria de H-I. Hemos comprobado que RepB requiere un sustrato superenrollado y la exposición del sitio de corte en conformación ssDNA, y que los iterones y el sitio de corte de RepB deben localizarse en fase, en la misma cara de la hélice del DNA. Se ha estimado que existe un dímero de RepC de pT181 por evento replicativo (Bargonetti *et al*, 1993); con lo cual si la cantidad intracelular de RepB fuese, asimismo, tan baja, aquellas moléculas de proteína que se hayan unido previamente a los iterones tendrán más ventajas que las moléculas que no se hayan unido, para reconocer y actuar sobre el sitio de corte (del Solar *et al*, 1993b; Moscoso *et al*, 1995b). La curvatura intrínseca existente entre los iterones y el sitio de corte (Fig. 35), podría proporcionar un brazo flexible que facilitase el acercamiento de la proteína unida a los iterones hacia el sitio de corte (Fig. 78A) y cuya flexibilidad se vería incrementada en presencia de Mn^{2+} (Laundon y Griffith, 1987). Alternativamente, se podría generar un plegamiento del DNA en esta región curvada del *dso*, que localizase el sitio de corte muy cerca de los iterones (de la Campa *et al*, 1990) (Fig. 78B). En cualquiera de los dos casos, se podría pensar

en la formación de un complejo proteína-DNA tipo nucleosoma, cuestión que vendría avalada por el patrón de hipersensibilidad a DNasa I observado tras la unión de la proteína al DNA (de la Campa *et al*, 1990) y por el papel esencial de los iterones en la replicación *in vivo*.

A



B

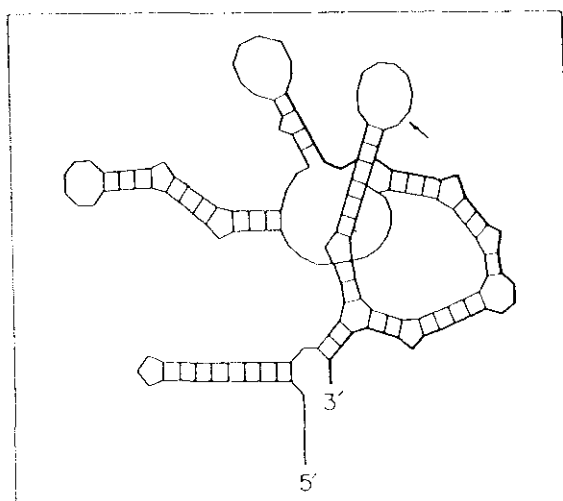


Figura 78. A. Modelo propuesto para la unión de RepB a los iterones y la introducción de un corte específico en la Horquilla I. **B.** Dibujo por ordenador basado en los programas de PCFOLD y MOLECULE que muestra el plegamiento del DNA más probable en la región del *dso*. De esta forma el sitio de corte de la proteína RepB (indicado con una flecha) y los tres iterones (línea gruesa) se encuentran juntos (de la Campa *et al*, 1990).

La iniciación de la replicación RC comparte características con la transferencia conjugativa del DNA (Waters y Guiney, 1993): proteínas codificadas por el plásmido a partir de genes de transferencia o movilización (proteínas Tra o Mob) introducen un corte específico en el origen de transferencia (*oriT*), se unen covalentemente al extremo 5' de la hebra cortada y la transfieren a la célula receptora, donde será copiada y ligada para formar una molécula de DNA plasmídico superenrollada. Sin embargo, hay que señalar que existen otros modelos alternativos de conjugación que implican la formación de un RNA cebador (Kingsman y Willets, 1978). La mayoría de las proteínas Rep y Mob (o Tra), tras introducir un corte en la molécula de DNA sustrato, quedan unidas covalentemente al extremo 5'-fosfato del sitio de corte (Langeveld *et al*, 1978; Thomas *et al*, 1990; Pansegrau *et al*, 1990; Scherzinger *et al*, 1992). Sin embargo, para la proteína gpII del fago fd no se ha demostrado la existencia de un complejo covalente estable con el extremo 5' del DNA (Meyer y Geider, 1979) y se desconoce cuál es el mecanismo para conservar la energía del corte para la reacción de ligación (Kornberg y Baker, 1992). Debido a que en los ensayos realizados con pLS1 y derivados, no se pudieron detectar y capturar intermediarios proteína-DNA covalentes estables, se pensó que la actividad de RepB podría ser semejante a la de la proteína gpII, bien a través de un enlace fosfodiéster transitorio o de una unión no-covalente, en la que son importantes las interacciones electrostáticas y los aa cargados positivamente (Moscoso *et al*, 1995a). En general, las proteínas Rep (o Tra) se unen al extremo 5' del sitio de corte, a través de la formación de un enlace tirosil-fosfodiéster. Este residuo Tyr ha sido identificado para las proteínas Rep de pC221 y pT181 (Tyr-188 y Tyr-191, respectivamente). En la proteína RepD de pC221 se ha comprobado que al substituir la Tyr activa por Phe o Ser, la proteína mutante mantiene la actividad de unión al DNA, pero es incapaz de unirse covalentemente al *dso* o de participar en la reacción de corte/cierre *in vitro* sobre DNA superenrollado (Thomas *et al*, 1990; Dempsey *et al*, 1992). En la proteína TraI del plásmido RP4 se han identificado dos motivos (designados como I y III) que están implicados en la catálisis de la reacción de corte/cierre; dentro del motivo I se ha identificado el residuo de Tyr (Tyr-22) implicado en la unión covalente de TraI al extremo 5' del DNA cortado, y en el motivo III se encuentra un residuo de His (His-116) esencial para la actividad de relajación de la proteína y que podría activar el grupo hidroxilo de la Tyr por medio de la abstracción de un protón (Pansegrau *et al*,

1994). Un análisis mutacional reveló que tras la substitución de la Tyr-22 por Phe, la proteína mutante conserva cierta actividad residual para el corte y la unión covalente al DNA, pero tras el cambio de la His-116 por Ser, la proteína no presenta actividad detectable de corte sobre la forma I del DNA (Pansegrau *et al*, 1994). Un análisis mutacional del gen que codifica para la proteína RepA de pC194 muestra que el sitio activo de la proteína contiene como mínimo tres aa (Tyr214, Glu142 y Glu210) que constituyen dos centros catalíticos no equivalentes. La iniciación de la replicación de pC194 se produciría tras el ataque nucleofílico sobre el enlace fosfodiéster por el grupo hidroxilo de la Tyr214; y el Glu142 facilitaría el ataque uniendo y posicionando un ión metálico que neutralizaría las cargas del sustrato fosfodiéster. El otro residuo (Glu210) participaría al final de una ronda de replicación mediante una reacción de hidrólisis (Noirot-Gros *et al*, 1994). En la proteína GpA de ϕ X174 se han identificado dos residuos de Tyr separados por tres aa (dentro de la secuencia YVAKYVNK) que pueden funcionar de modo equivalente como aceptores de la cadena de DNA durante la reacción de corte (van Mansfeld *et al*, 1986). En un principio se propuso un modelo en el cual ambas Tyr podrían alternar entre sí las reacciones de corte y ligación, y transferirse la molécula de DNA de una Tyr a otra (van Mansfeld *et al*, 1986). Sin embargo, en un análisis posterior se comprobó que no se produce una transferencia del DNA unido a la Tyr-343 hacia la Tyr-347 (o viceversa) sobre la misma molécula de proteína (Hanai y Wang, 1993), sino que las dos Tyr de una única molécula participan en las reacciones de corte y ligación, alternándose en la catálisis de la transferencia de hebra, sin que la actividad de una Tyr dependa de la presencia de la otra. En la proteína gpII del fago fd también se han encontrado dos residuos de Tyr separados por tres aa en la secuencia RYFGFYR (Beck *et al*, 1978) que podrían estar implicados en la reacción de corte/cierre del DNA, aunque como ya hemos indicado no se han encontrado complejos covalentes proteína gpII-DNA (Meyer y Geider, 1979). En la proteína RepB de pLS1 existen cuatro residuos de Tyr (en las posiciones 14, 97, 99 y 115) que podrían ser posibles candidatos para realizar el ataque nucleofílico sobre el enlace fosfodiéster existente entre los nt G y A del origen. Por homologías de secuencia entre las proteínas Rep de los plásmidos de la familia (ver más adelante) y comparación con el motivo UXXYUXhXXX, conservado entre proteínas Rep y Mob (Ilyina y Koonin, 1992), postulamos que el residuo de Tyr activo de RepB estaría localizado en la posición 99 dentro de la región R-IV

(NVENMYLYLTHESKD). Tras la substitución de este residuo de Tyr99 por Phe o Ser, se pudo comprobar que las proteínas mutantes conservan la capacidad de unión a los iterones del origen, y sólo la proteína RepBY99F (cambio de la Tyr99 por Phe) mantiene cierta actividad residual de corte/cierre y de transferasa de hebra sobre oligonucleótidos. Esta actividad residual podría deberse al residuo de Tyr localizado en la posición 97 de RepB o a la Tyr115 de la R-V, región que podría formar parte del centro activo de la proteína. Aunque el residuo de Ser podría proporcionar un grupo hidroxilo capaz de realizar el ataque nucleofílico sobre el DNA, el cambio introducido en la estructura del centro activo de la proteína podría ser mayor que el producido con la substitución por Phe, ya que el volumen específico parcial de este residuo (Phe, 0.77 ml/g) se acerca más al valor de la Tyr (0.71 ml/g) que el de la Ser (0.63 ml/g) (Laue *et al*, 1992). Aunque no se han aislado intermediarios covalentes RepB-DNA, se identificó el residuo Tyr99 como el responsable de realizar el ataque nucleofílico sobre el enlace fosfodiéster del DNA.

Se ha propuesto la existencia de dos mecanismos de transesterificación enzimática de los enlaces fosfodiéster (Mizuuchi, 1992): i) transesterificación directa (un solo paso) entre dos moléculas sustrato, como ocurre en las transferencias de nucleótidos catalizadas por las DNA y RNA polimerasas (Knowles, 1980; Eckstein, 1985) y ii) a través de la formación de un intermediario covalente mediante dos pasos de transesterificación, uno para formar y otro para resolver el intermediario, como sucede en la recombinación específica de sitio y la relajación por las DNA topoisomerasas (Wang, 1985). El mecanismo de transesterificación se puede conocer a través del estudio de la estereoquímica del fosfato implicado en la reacción de transferencia; para ello, el fosfato debe ser quiral y esto se consigue substituyendo uno de los oxígenos que no forma parte del enlace, por un átomo de azufre. Tras separar los dos isómeros (configuración R_p y S_p), se realiza la transferencia de DNA y se analiza la quiralidad del producto obtenido utilizando dos nucleasas con estereoespecificidad por los enlaces fosforotioato en el DNA. En cada paso de transferencia la quiralidad del fosfato se invierte. Si la existencia de un intermediario covalente requiere un mínimo de dos pasos de transferencia, la quiralidad del fosfato se mantiene, como se ha demostrado en la reacción de integración del fago λ (Mizuuchi y Adzuma, 1991) o en la transferencia del DNA de ϕ X174 por la proteína

GpA* (Hanai y Wang, 1993). Sin embargo, cuando la reacción de transferencia se realiza en un solo paso, la quiralidad del fosfato reactivo se invierte como ocurre con la reacción de transferencia del fago Mu (Mizuuchi y Adzuma, 1991). En este caso, la proteína MuA, mediante su actividad endonucleásica, corta el DNA donador para exponer los extremos 3'-OH de la secuencia de Mu; y mediante la abstracción de un protón, activa los extremos 3'-oxígeno del DNA donador para que puedan actuar como nucleófilos sobre el DNA receptor. El corte del DNA receptor y su unión al DNA donador son sucesos mecánica y temporalmente inseparables (Mizuuchi y Adzuma, 1991). Posiblemente, la proteína gpII del fago fd actúa mediante un mecanismo similar a la transferencia del fago Mu, ya que no se han detectado intermediarios covalentes. Sin embargo, no se ha analizado la quiralidad del fosfato que podría estar implicado en la unión proteína gpII-DNA. Dado que RepB podría actuar como gpII, se diseñaron experimentos para analizar la estereoquímica del fosfato implicado en la reacción de corte. Aunque salvando las dificultades técnicas que se nos presentaron al realizar los experimentos, podemos decir que nuestros resultados apuntan a la existencia de un intermediario covalente entre RepB-DNA, que se produce de forma muy rápida, por lo que no hemos podido capturar o detectar estos intermediarios empleando métodos más convencionales.

Al final de la ronda replicativa, una vez que se ha sintetizado la cadena(+) nueva del plásmido, las proteínas Rep van a intervenir de nuevo en el proceso replicativo, participando en la terminación de la replicación como se ha demostrado en los fagos ϕ X174 y fd (van der Ende *et al*, 1978; Meyer *et al*, 1981), y más recientemente en los plásmidos de la familia de pT181 (Murray *et al*, 1989; Rasooly y Novick, 1993; Rasooly *et al*, 1994a). Al final del ciclo replicativo, la proteína Rep debe reconocer el *dso* regenerado e introducir un corte para separar la cadena(+) parental y la cadena nueva. Este reconocimiento del *dso* no parece ser tan estricto como ocurre en la iniciación, ya que se han observado terminaciones abortivas en secuencias similares, pero no idénticas, al origen (Michel y Ehrlich, 1986; Ballester *et al*, 1989). En algunos casos, la terminación sólo requiere una parte de la secuencia del *dso* como ocurre en los fagos Ff (Dotto *et al*, 1984) o en el plásmido pC194 (Gros *et al*, 1987). En los plásmidos de la familia de pT181, así como en pUB110, la terminación de la replicación implica la inactivación de la proteína Rep después de su uso, mediante

una modificación covalente que conduce a la aparición de una molécula inactiva Rep*, de menor movilidad electroforética que la Rep activa (Rasooly y Novick, 1993; Rasooly *et al*, 1994a, 1994b; Müller *et al*, 1995). Desafortunadamente, los autores han señalado esta molécula inactiva como Rep*, denominación que se ha usado previamente, para nombrar las proteínas Rep (GpA* de ϕ X174 o RepB* de pLS1) que se traducen a partir de un segundo ATG. El grupo hidroxilo de la Tyr activa de una de las subunidades del homodímero de RepC realiza el ataque nucleofílico sobre el enlace fosfodiéster de los nt T y A del *dso*, para iniciar la replicación; con lo cual esta subunidad queda unida covalentemente al extremo 5' de la hebra desplazada. Cuando se completa la ronda replicativa (Fig. 6), la síntesis continúa unos 12 nt más allá del origen. La subunidad de RepC que no se ha usado introduce un corte en el nuevo *dso* reconstituido, y a través de una serie de ataques nucleofílicos mediados por los grupos 3'-OH del DNA y de la Tyr, se generan tres productos: un intermediario ssDNA, una molécula dsDNA y un heterodímero de RepC, que contiene una de las subunidades (RepC*) unida covalentemente a un oligonucleótido (Rasooly y Novick, 1993; Rasooly *et al*, 1994b). A diferencia de lo que ocurre en pT181, donde se obtiene un heterodímero de RepC inactivo, la proteína RepU de pUB110 podría ser convertida durante la replicación en un hetero-oligómero inactivo RepU-RepU* (Müller *et al*, 1995). Sin embargo, el heterodímero RepD-RepD* de pC221 conserva actividad, si bien reducida (C.D. Thomas, comunicación personal). Para el plásmido pC194 se ha propuesto un mecanismo de terminación alternativo basado en una reacción de hidrólisis, en la cual el residuo Glu210 activaría una molécula de agua, directamente o a través de la quelación de un ión metálico, para que se produzca un ataque nucleofílico sobre el enlace fosfodiéster de la nueva hebra sintetizada (Noirot-Gros *et al*, 1994). Se ha comprobado que los intermediarios covalentes topoisomerasa I-DNA son capaces de catalizar una reacción de hidrólisis del enlace 3'-fosfotirosil (Christiansen *et al*, 1994). A través del estudio de la actividad de cierre o ligación de RepB sobre oligonucleótidos, tenemos datos para suponer que la terminación de la replicación de pLS1 requiere específicamente la secuencia 5'-TACTACG-3' localizada a 5' del sitio de corte. Hasta el momento se desconoce si la terminación de la replicación de pLS1 se produce a través del mecanismo de inactivación de la proteína Rep, como sucede en pT181 o si el mecanismo de transesterificación se produce a través de una reacción de hidrólisis, como se ha sugerido para pC194. En la proteína

RepB existen dos residuos Glu, presentes en la mayoría de los miembros de la familia: Glu103, separado por tres aa del residuo activo de Tyr99, y Glu16 localizado dentro de la región R-I de función desconocida; por tanto, aún no se puede descartar la existencia de un mecanismo similar al que se ha sugerido en pC194.

4. FAMILIA DE pLS1

Como hemos comentado al inicio de este trabajo, los plásmidos con replicación tipo RC se pueden agrupar en cuatro familias principales (Novick, 1989), tomando como base homologías a nivel de la secuencia de DNA y de la organización genética de la región LIC. La familia representada por pLS1 incluye, hasta el momento, a once plásmidos de bacterias tanto gram(+) como gram(-) (ver Tabla 1), y alguno de sus miembros puede replicar en los dos tipos de bacterias (Lacks *et al*, 1986; Leenhouts *et al*, 1991). Las características más generales de esta familia podrían ser: i) la localización del *dso* en una región intergénica; ii) la presencia de secuencias directamente repetidas en el origen, y iii) la existencia de dos elementos reguladores de la replicación.

El *dso* de los plásmidos de la familia de pLS1 podría dividirse en dos regiones separadas físicamente y que, por similitud con el *dso* de pLS1, podrían ser funcionalmente distintas. La región *nic*, que está formada por una o dos posibles estructuras cruciformes, contendría el sitio de corte de la proteína Rep. La región *bind*, que consta de dos o tres repeticiones directas, sería el sitio de unión de la proteína Rep. El alineamiento de las secuencias de DNA del *dso* nos muestra que en casi todos los plásmidos se conserva la secuencia de 9 pb (5'-TACTACGAC-3') que contiene el sitio de corte de RepB (de la Campa *et al*, 1990; Moscoso *et al*, 1995a) y un pequeño grupo de nt situados "corriente abajo" del sitio de corte (Fig. 79). En todos los casos (con la excepción de pKMK1), la secuencia conservada se podría localizar en un lazo terminal o interno de una posible estructura cruciforme. Esto nos sugiere que, al igual que ocurre en pLS1, se necesitaría la generación de estructuras cruciformes en el *dso* para exponer el sitio de corte en forma monocatenaria y además, el sustrato replicativo debería ser la forma superenrollada del plásmido. En

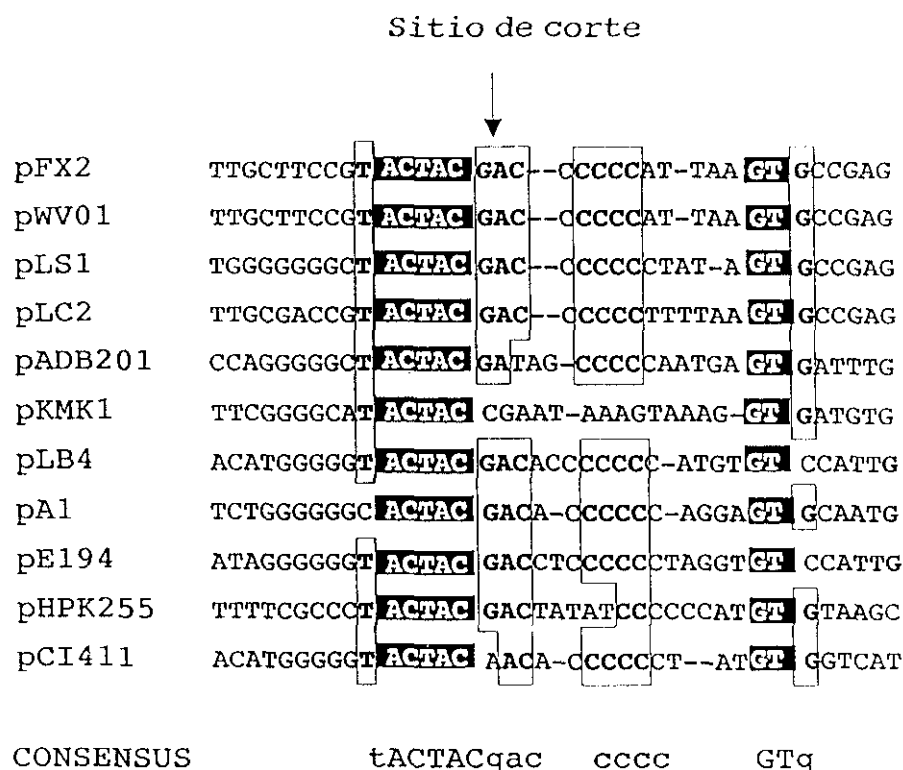


Figura 79. Alineamiento de la región *nic* del *dso* de los plásmidos de la familia de pLS1. En la parte inferior se muestran en letras mayúsculas, las bases conservadas en todos los plásmidos y en letras minúsculas, las bases conservadas en la mayoría de los miembros. Las coordenadas del alineamiento PILEUP realizado, son: pFX2 (1082 y 1176), pWV01 (322 y 418), pLS1 (400 y 495), pLC2 (807 y 902), pADB201 (31 y 127), pKMK1 (1737 y 1831), pLB4 (1972 y 2068), pA1 (742 y 837), pE194 (843 y 936), pHPK255 (231 y 324), pCI411 (1170 y 1265).

el plásmido pKMK1, el posible sitio de corte G/A se encontraría en la región apareada de la estructura cruciforme (King y Dybvig, 1992), aunque está localizado al inicio de una región A-T que facilitaría su exposición en forma monocatenaria. Como ya hemos indicado, todos los plásmidos de esta familia contienen secuencias directamente repetidas (iterones) que varían en su secuencia, tamaño (de 5 a 21 nt) y en la distancia que les separa del posible sitio de corte de la proteína Rep (desde 13 a 91 pb) (Tabla 10). La proteína RepB de pLS1 se une, *in vitro*, a las tres repeticiones del origen (de la Campa *et al*, 1990). Sin embargo, en algunos de los plásmidos no se ha indicado su existencia o no se les ha asignado función alguna. Como veremos más adelante, aquellos plásmidos con iterones parecidos (como por

Tabla 10. Sitios de corte de las proteínas Rep e iterones propuestos para los plásmidos de la familia de pLS1. Se indica el posible sitio de corte (/), el número de iterones presentes en el *dso*, su secuencia y la distancia (en pb) que les separa del sitio de corte de la proteína Rep.

Plásmido	Sitio de corte	Distancia	Iterón	Número
pLS1	TACTACG/AC	84	TCGGCGACTTT	3
pWV01	TACTACG/AC	83	TCGCCAACGTTT	3
pFX2	TACTACG/AC	83	TCGCCAACGTTT	3
pE194	TACTACG/AC	15	GTCCATT	3
pLB4	TACTACG/AC	14	GTCCATT	2
pA1	CACTACG/AC	13	GTGCAAT	3
pLC2	TACTACG/AC	35	ACAAACCC	2
pHPK255	TACTACG/AC	19	AAGCTAC	2
pADB201	TACTACG/AT	55	TGTTTTGCTAGCATTTGTAA	3
pKMK1	TACTACCG/AA	91	GTTTT	3
pCI411	TACTACA/AA	13	TGGTCATT	3

ejemplo, pLS1 con pFX2/pWV01 o pE194 con pLB4) presentan también un mayor porcentaje de homología en sus proteínas Rep. Otra característica de la región del *dso*, que también está presente en la familia de pT181 (Novick, 1989), es el relativamente alto contenido en G+C del *dso*, que contrasta con el bajo porcentaje existente en la secuencia total del plásmido (Tabla 11). El sitio de corte de la proteína Rep se ha determinado para pLS1 entre los nt G y A de la secuencia consenso de 9 nt (5'-TACTACG/AC-3') y, en base a datos genéticos, se ha postulado para pE194 (Sozhamannan *et al*, 1990). Como la proteína RepB presentó actividad de corte/cierre sobre el DNA superenrollado de los plásmidos pFX2 y pE194, y actividad de corte sobre oligonucleótidos de 23-mer con la región *nic* de la mayoría de los plásmidos de la familia, nosotros proponemos que las proteínas Rep de estos plásmidos (con la excepción de pADB201) introducen el corte entre los nt G y A de la secuencia consenso (Moscoso *et al*, 1995b). RepB no presentó actividad sobre el oligonucleótido con la secuencia de pADB201, posiblemente por la ausencia de la C a 2 nt del sitio de corte, que es esencial para su actividad; por tanto, quedaría por determinar, de forma no ambigua, el sitio de corte en este plásmido.

Plásmido	G+C (%)
pFX2	33.79
pFX2 (1080, 1160)	45.68
pWV01	33.47
pWV01 (320, 400)	48.15
pLS1	37.23
pLS1 (410, 490)	43.21
pLC2	33.66
pLC2 (810, 890)	56.79
pADB201	29.41
pADB201 (30, 110)	49.38
pKMK1	29.01
pKMK1 (1740, 1820)	41.98
pLB4	37.95
pLB4 (1980, 2060)	45.68
pA1	34.93
pA1 (760, 840)	45.68
pE194	31.71
pE194 (850, 930)	49.38
pHPK255	36.77
pHPK255 (240, 320)	41.97
pCI411	35.14
pCI411 (1180, 1260)	44.44

Tabla 11. Contenido en G+C de los plásmidos de la familia de pLS1. Se indica el porcentaje G+C en la secuencia total del plásmido y en la región del *dso*.

El alineamiento de las secuencias de las proteínas Rep de la familia de pLS1 (Fig. 80) nos muestra la existencia de bloques de aa conservados en la región N-terminal y central, y una mayor divergencia hacia la región C-terminal. Si pensamos que en el *dso* se encuentra también una región altamente conservada (la región *nic*) y otra de mayor divergencia (la región *bind*), podremos proponer que la región N-terminal de las proteínas Rep estaría implicada en la actividad nucleotidiltransferasa sobre la región *nic* y que el dominio C-terminal participaría en el reconocimiento de los iterones de la región *bind*. Las proteínas Rep de la familia de pT181 presentan el determinante de especificidad en la región C-terminal, y el sitio activo se encuentra en la región central (Novick, 1989; Dempsey *et al*, 1992). La comparación de las regiones conservadas (R-I a R-V) con los motivos 1, 2 y 3 propuestos por Ilyina y Koonin

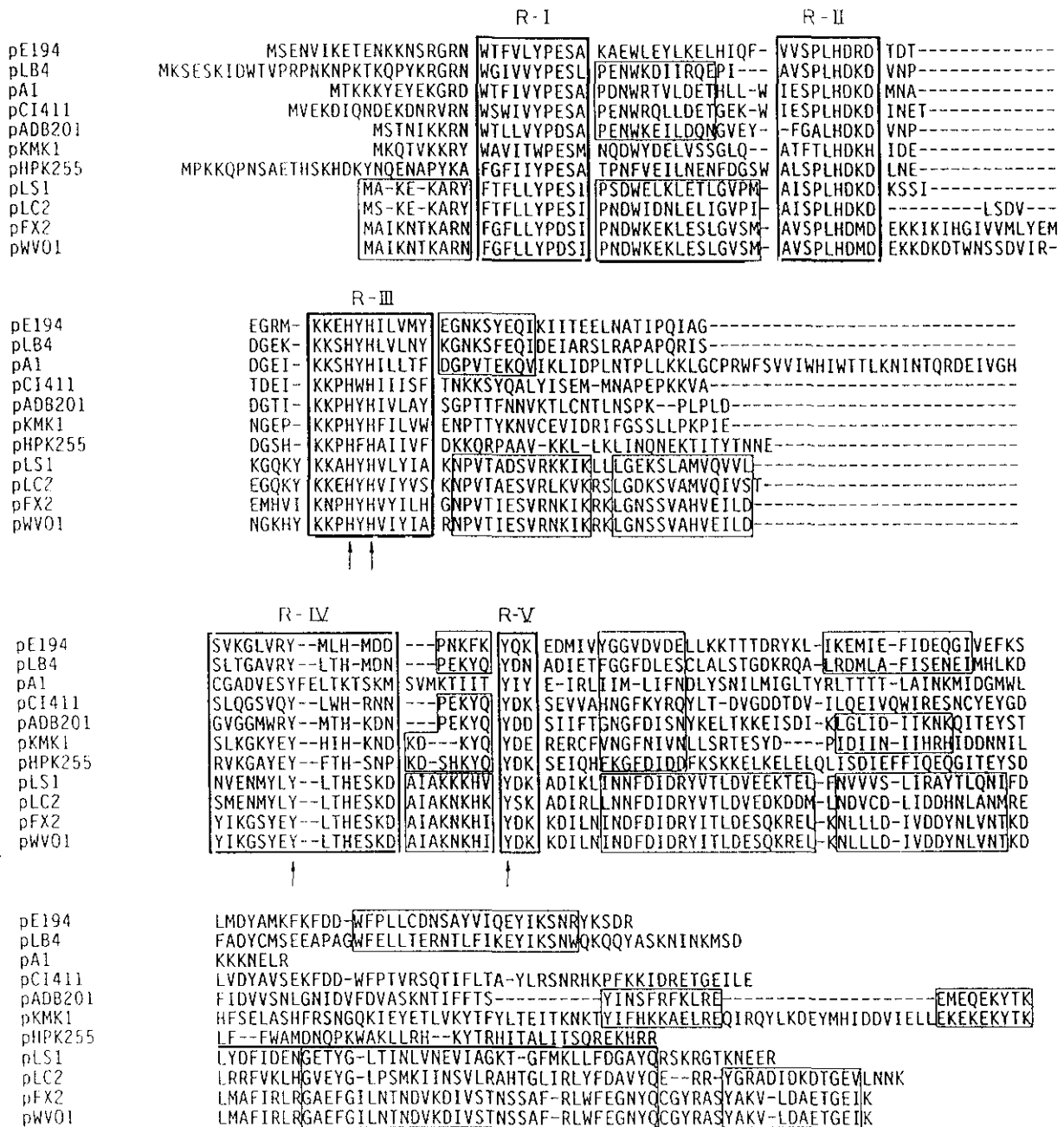


Figura 80. Alineamiento de la secuencia de aa de las proteínas Rep de los plásmidos de la familia de pLS1. Se indican mediante recuadros gruesos, las regiones conservadas R-I a R-V entre todos los miembros de la familia. En recuadros finos se indican otras homologías que podrían definir tres subfamilias. Las flechas indican los residuos Tyr (regiones R-IV y R-V) e His (región R-III) conservados.

(1992), nos conduce a postular la existencia de un motivo 3 más amplio y de dos motivos extra en la familia de pLS1. El motivo 1 (cuya secuencia consenso es FUuypXXX, donde U representa un residuo hidrofóbico y X, cualquier residuo) se corresponde con la región R-I de las proteínas Rep. Si bien no se le ha asignado ninguna función todavía, parece ser esencial para la actividad funcional de estas proteínas Rep, ya que hemos comprobado que un derivado de pLS1 que carece de esta región (pLS1 Δ A15 con RepB*) no se puede establecer en *S.pneumoniae*, a menos que se le suministre en *trans* la proteína RepB completa (del Solar *et al*, 1993b). Una posible función para la región R-I sería que el residuo Glu o Asp, presente en todos los miembros, facilitase el ataque nucleofílico de la Tyr activa, mediante la unión y posicionamiento de un ión metálico que neutralizase las cargas negativas del sustrato fosfodiéster, como se ha propuesto en pC194 (Noirot-Gros *et al*, 1994). El motivo 2 (cuya secuencia consenso es XpHUHuUUX) que se corresponde con la región R-III, se caracteriza por la presencia de dos His conservadas en un entorno hidrofóbico y se ha propuesto que estaría implicado en la coordinación de iones metálicos (Ilyina y Koonin, 1992). Finalmente, el motivo 3 (de secuencia UXXYUXhXXX) contendría el putativo residuo de Tyr implicado en la unión al DNA, y se corresponde con la región R-IV de la proteína Rep. En esta región de RepB hemos identificado la Tyr99 como parte de sitio activo de la proteína. En las proteínas Rep de la familia de pLS1 se han identificado dos motivos nuevos, R-II y R-V, que podrían ser específicos de la familia. El motivo R-V contiene una Tyr conservada entre los miembros de la familia y pensamos que quizás forme parte del centro activo de la proteína. El motivo R-II, al cual no se le ha asignado ninguna función todavía, contiene otro posible motivo de unión a cationes ("DKD"; Argos, 1988; Pansegrau *et al*, 1994) y un residuo de His conservado, que podría actuar como intermediario en la activación de una molécula de agua promovida por un grupo carboxilo (por ejemplo, de algún Asp presente en esa región) como ocurre en la DNasa I (Lahm *et al*, 1991) o podría activar el grupo hidroxilo del residuo Tyr mediante la abstracción de un protón, como sucede en la proteína TraI del plásmido RP4 (Pansegrau *et al*, 1994).

Junto con las homologías existentes en la región del *dso* y en las proteínas Rep, los plásmidos de la familia de pLS1 presentan una organización genética similar y

analogías a nivel de los elementos reguladores de la replicación del plásmido: un represor transcripcional (la proteína Cop) y un RNA antisense. Todos los plásmidos, con la excepción de pHPK255 (Kleanthous *et al*, 1991), podrían codificar proteínas Cop pequeñas (entre 45 y 55 aa) con el putativo motivo HTH de unión a DNA. Probablemente en todos los casos, los genes *cop* y *rep* se transcriben a partir de un único promotor (P_{cr}), como ocurre en pLS1. Aunque no se ha demostrado todavía, en todos los plásmidos se podría transcribir un pequeño ctRNA que solaparía con las señales de iniciación de la traducción del gen *rep* (del Solar *et al*, 1993c, 1995a).

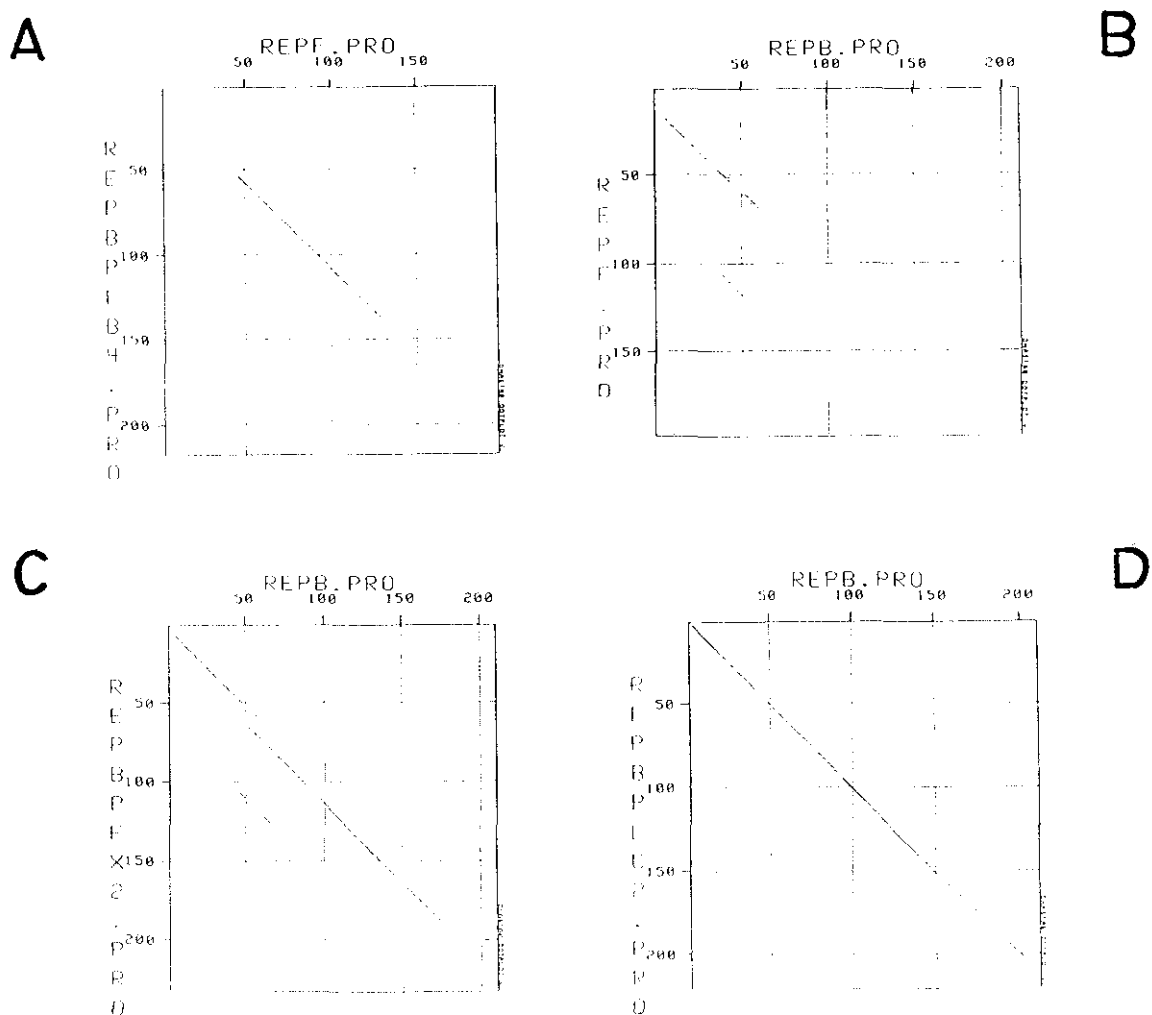


Figura 81. Comparación entre algunas proteínas Rep de la familia de pLS1 (programa DOTPLOT). Los puntos indican los residuos homólogos entre las proteínas. Las proteínas comparadas son: RepB de pLS1, RepF de pE194, RepB de pLB4, RepB de pFX2 (que ha sido renombrada en el texto como RepX) y RepB de pLC2.

Basándonos en las homologías existentes entre los iterones de algunos plásmidos de la familia, en las diferentes distancias entre los iterones y el sitio de corte, y en los distintos grados de homologías de la región C-terminal de las proteínas Rep, podemos considerar la existencia de tres subfamilias diferentes. Una de ellas incluiría a los plásmidos pE194 de *S.aureus* (Horinouchi y Weisblum, 1982a; Villafane *et al*, 1987), pLB4 y pA1 de *L.plantarum* (Bates y Gilbert, 1989; Vujcic y Topoisirovic, 1993); pE194 y pLB4 poseen iterones idénticos y sus proteínas Rep presentan una gran homología tanto a nivel de su región N-terminal como C-terminal (Fig. 81). El subgrupo de pLS1 estaría formado por el plásmido pLC2 de *L.curvatus* (Klein *et al*, 1993) y dos plásmidos de *L.lactis*, pFX2 y pWV01 (Xu *et al*, 1991; Leenthous *et al*, 1991), que son prácticamente idénticos. Aunque respecto a los otros miembros de su grupo, pLC2 presenta una clara diferencia en los iterones y en la distancia que los separa del sitio de corte, su proteína Rep es la que presenta un mayor porcentaje de

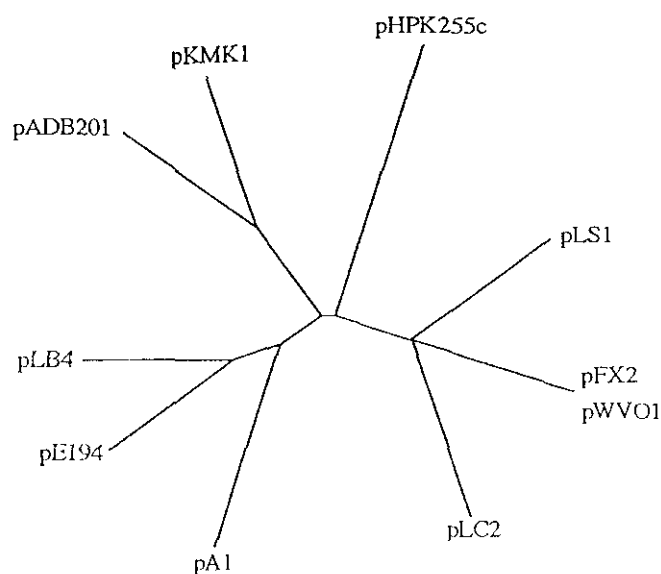


Figura 82. Diagrama filogenético de los miembros de la familia de pLS1, basado en las homologías de secuencia en las proteínas Rep.

identidad (59.4%) con la proteína RepB de pLS1, tanto en la región N- como C-terminal (Fig. 81). Un tercer subgrupo estaría formado por los plásmidos pHPK255 de *H.pylori* (Kleanthous *et al*, 1991), pADB201 y pKMK1 de *M.pylori* (Bergemann *et al*, 1989; King y Dybvig, 1992) y pCI411 de *Leuconostoc lactis* (Coffey *et al*, 1994). El grado de homología existente entre la proteína RepB de pLS1 y las proteínas Rep de los plásmidos pE194, pFX2 y pLC2 se muestra en la Figura 81. Un diagrama filogenético de los miembros de la familia de pLS1 basado en las similitudes entre las proteínas Rep (Fig. 82), nos indica las posibles relaciones existentes y nos sugiere la posibilidad de que todos deriven de un ancestro común. El plásmido pHPK255 de *H.pylori* (Kleanthous *et al*, 1991), una bacteria gram(-), es el que se encuentra más alejado filogenéticamente del resto de los miembros. No debemos olvidar que aunque los plásmidos con replicación tipo RC, están contruidos por módulos genéticos intercambiables (Projan y Novick, 1988) y la región LIC (región de iniciación y control) presenta un alto grado de homología entre los distintos miembros de la familia, otros módulos como la región DET y el *ssb*, presentan un mayor grado de divergencia, lo que nos hace suponer que en cada huésped la molécula plasmídica ha adoptado las condiciones más eficientes para su proceso replicativo y su mantenimiento en la célula huésped correspondiente.

CONCLUSIONES

RESUMEN Y CONCLUSIONES

La realización de esta Tesis Doctoral se ha basado principalmente en el estudio de las interacciones existentes entre la proteína iniciadora de la replicación, RepB y el origen de doble cadena (*dso*) del plásmido pLS1.

Basándonos en análisis de delección realizados previamente a este trabajo, se pudo delimitar el origen funcional *in vivo* de pLS1, dentro de un fragmento de 247 pb (entre las coordenadas 402 y 648 de pLS1). Se comprobó que este origen puede ser dividido física y funcionalmente en dos regiones separadas: la región *nic*, donde la proteína produce el corte en el DNA y la región *bind*, que incluye los tres iterones a los cuales se une *in vitro* la proteína RepB. El análisis *in vivo* de ambas regiones reveló que sólo cuando se clona el *dso* entero de pLS1 en un replicón compatible se observa cierta incompatibilidad frente al pLS1, lo cual sugiere la necesidad de las dos regiones del origen (región *bind* y *nic*) para la funcionalidad *in vivo* de RepB y que ninguna de las dos regiones por separado son suficientes para secuestrar RepB y reducir el número de copias de pLS1.

Se comprobó que la proteína RepB actúa *in trans*, como corresponde lógicamente a una proteína iniciadora de la replicación RC plasmídica.

Tras purificar la proteína RepB a partir del sistema de clonaje vector pET5/huésped *E.coli* BL21(DE3), se determinó la masa molecular de RepB mediante equilibrio de sedimentación y se vio que la preparación de RepB corresponde aproximadamente a la de un hexámero.

Se pusieron a punto las condiciones para el análisis de la actividad tipo topoisomerasa I de la proteína RepB sobre DNA superenrollado. Se estudió la influencia de la temperatura y de la concentración de sustrato sobre la actividad de RepB.

La actividad de RepB sobre DNA plasmídico superenrollado (FI) genera dos

tipos de moléculas: formas circular abiertas (FII; producto de la actividad de corte) y formas circular relajadas (FI'; producto de la actividad de corte/cierre).

Se comprobó que *in vitro*, la relajación de DNA superenrollado por RepB no requiere la unión previa de la proteína iniciadora a la región *bind*, y se ha demostrado que la actividad de RepB es dependiente de hebra pero independiente de orientación sobre DNA superenrollado. Por el contrario, se sabe que el papel de los iterones *in vivo* es fundamental para la replicación del plásmido, y el hecho de no haber obtenido un replicón que tuviese los iterones y el sitio de corte situados en fases distintas, favorece la siguiente hipótesis: RepB reconocería *in vivo* los iterones y al unirse a ellos adoptaría la posición adecuada para reconocer el sitio de corte en la región *nic*, situado 84 bp hacia la izquierda.

Se demostró que la proteína RepB es capaz de reconocer y actuar sobre derivados de pLS1 (carentes de potenciales estructuras secundarias o que poseen mutaciones puntuales o deleciones en los genes *copG* y *repB*). Las diferencias observadas en la actividad de RepB sobre los distintos derivados podría ser debido al mayor o menor grado de superenrollamiento del DNA plasmídico, que favorecería una mayor o menor extrusión de la Horquilla I y en consecuencia la exposición del sitio de corte de RepB como ssDNA.

La actividad de RepB es dependiente de la temperatura y se sabe que la reacción transcurre de forma muy rápida a 60°C. Probablemente a esta temperatura, la fracción de moléculas potencialmente sensibles a RepB (que presentan la Horquilla I extruída y el sitio de corte como ssDNA) es sustancialmente mayor.

La proteína RepB presenta actividad sobre oligonucleótidos monocatenarios que contengan la región *nic* del *dso* de pLS1. Su actividad de corte es específica de secuencia y no requiere la generación de una estructura secundaria en un oligo monocatenario que contenga el sitio de corte.

La proteína reconoce la siguiente secuencia consenso de 9 nt: 5'-TACTACR/HC-3' (siendo R= base púrica y H= cualquier base excepto G). La C situada a 2 bases

del sitio de corte es importante en el reconocimiento de la secuencia.

La proteína RepB no presenta actividad detectable sobre DNA lineal, ya se trate de DNA plasmídico linearizado o de un oligonucleótido bicatenario que contenga la región de corte.

La proteína RepB es capaz de cortar y unir los dos extremos de un oligonucleótido que contenga la región *nic* del origen de pLS1. Pero RepB sólo presenta actividad de cierre cuando el 5'-fosfato necesario para la reacción de cierre ha sido previamente generado por ella y si el extremo 3'-OH conserva la secuencia TACTACG_{OH} reconocida por la proteína. Parece que la reacción de corte mediada por RepB libera un 5'-fosfato "activado" situado a 3' del sitio de corte. La proteína puede asimismo intercambiar los extremos generados tras el corte de dos oligos que contengan la región *nic*.

A través de los métodos tradicionales (análisis de la interfase agua-fenol, precipitación con K⁺-SDS o retardo en gel) no se han podido detectar intermediarios covalentes proteína-DNA. En los ensayos con oligonucleótidos marcados en su extremo 3', tampoco se detectaron complejos proteína-oligo covalentes, como bandas retardadas en el gel de secuencia.

Gracias a los ensayos de unión en filtro se sabe que los complejos RepB-DNA son muy sensibles a la concentración de SDS, y presentan cierta sensibilidad frente a las concentraciones altas de sal y valores de pH por encima de su punto isoeléctrico (pH 8.8). Esto nos indica la existencia de ciertas interacciones electrostáticas entre la proteína y el DNA, y que los aa cargados positivamente son importantes en el tipo de interacción que se produce entre RepB y el DNA. La unión de RepB al DNA se podría producir a través de un enlace fosfodiéster transitorio, como sucede con la proteína gpII del fago fd (Meyer y Geider, 1979) o bien a través de una unión no-covalente, en la que son importantes las interacciones electrostáticas y los aa cargados positivamente. Sin embargo, tras analizar la actividad de corte/cierre de RepB sobre un sustrato con un fosfato quiral (situado en la posición del fosfato que interviene en el enlace proteína-DNA), parece ser que la quiralidad del fosfato se conserva, lo cual

sería indicativo de la existencia de un posible intermediario covalente.

RepB es capaz de reconocer *dso* de plásmidos relacionados tanto sobre DNA superenrollado como en oligonucleótidos ssDNA. Para la actividad de RepB sobre DNA superenrollado, es necesario que exista cierto grado de superenrollamiento para que se produzca la extrusión de la estructura secundaria de la región *nic*, y quede expuesto el sitio de corte como ssDNA.

Mediante mutagénesis dirigida se ha cambiado la Tyr99 de RepB por una Phe y una Ser. Tras la purificación de las dos proteínas mutantes, se pudo comprobar que estas proteínas carecen de actividad replicativa y de corte/cierre sobre DNA superenrollado, aunque se unen normalmente a DNA. Sólo la proteína RepBY99F presenta un porcentaje muy residual de actividad de corte y nucleotidiltransferasa sobre oligonucleótidos. La actividad de unión a la región *bind* del origen, no se ve afectada por el cambio de Tyr99 a Phe o Ser.

Mediante homologías de secuencia de los genes *rep* de la familia de pLS1, se ha propuesto que la región N-terminal de la proteína RepB estaría implicada en la actividad nucleotidiltransferasa de la proteína y la región C-terminal participaría en el reconocimiento de los iterones.

BIBLIOGRAFIA

- Abeles, A.L. and Austin, S.J.** (1987). P1 plasmid replication requires methylated DNA. *EMBO J.* **10**: 3185-3189.
- Alonso, J.C., Leonhardt, H. and Stiege, C.A.** (1988). Functional analysis of the leading strand replication origin of plasmid pUB110 in *Bacillus subtilis*. *Nucl. Acids Res.* **16**: 9127-9145.
- Argos, P.** (1988). A sequence motif in many polymerases. *Nucl. Acids Res.* **16**: 9909-9916.
- Avemann, K., Knippers, R., Koller, T. and Sogo, J.** (1988). Camptothecin, a specific inhibitor of type I DNA topoisomerase, induces DNA breakage at replication forks. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 3026-3034.
- Baas, P.D. and Jansz, H.S.** (1988). Single-stranded DNA phage origins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **136**: 31-70.
- Baas, P.D., Liewerink, H., van Teeffelen, H.A., van Mansfeld, A.D., van Boom, J.H. and Jansz, H.S.** (1987). Alteration of the ATG start codon of the A* protein of bacteriophage ϕ X174 into an ATT codon yields a viable phage indicating that A* protein is not essential for ϕ X174 reproduction. *FEBS Lett.* **218**: 119-125.
- Bachmann, B.J.** (1972). Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol. Rev.* **36**: 525-557.
- Ballester, S., Alonso, J.C., López, P. and Espinosa, M.** (1990). Comparative expression of the pC194-cat gene in *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene* **86**: 71-79.
- Ballester, S., López, P., Alonso, J.C., Espinosa, M. and Lacks, S.A.** (1986). Selective advantage of deletions enhancing chloramphenicol acetyltransferase gene expression in *Streptococcus pneumoniae* plasmids. *Gene* **41**: 153-163.
- Ballester, S., López, P., Espinosa, M., Alonso, J.C. and Lacks, S.A.** (1989). Plasmid structural instability associated with pC194 replication functions. *J. Bacteriol.* **171**: 2271-2277.
- Bargonetti, J., Wang, P.-Z. and Novick, R.P.** (1993). Measurement of gene expression by translational coupling: effect of copy mutations on pT181 initiator synthesis. *EMBO J.* **12**: 3659-3667.
- Bates, E.E.M. and Gilbert, H.J.** (1989). Characterization of a cryptic plasmid from *Lactobacillus plantarum*. *Gene* **85**: 253-258.
- Beck, E., Sommer, R., Auerswald, E.A., Kurz, C., Zink, B., Osterburg, G., Schaller, H., Sugino, K., Sugisaki, H., Okamoto, T. and Takanami, M.** (1978). Nucleotide sequence of bacteriophage fd DNA. *Nucl. Acids Res.* **5**: 4495-4503.

- Beese, L.S. and Steitz, T.A. (1991) Structural basis for the 3'→5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *EMBO J.* 10: 25-33.
- Bergemann, A.D., Whitley, J.C. and Finch, L.R. (1989). Homology of mycoplasma plasmid pADB201 and staphylococcal plasmid pE194. *J. Bacteriol.* 171: 593-595.
- Bhriain, N. and Dorman, C. (1993). Isolation and characterization of a *topA* mutant of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* 7: 351-358.
- Birch, P. and Khan, S.A. (1992). Replication of single-stranded plasmid pT181 DNA *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 290-294.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Boe, L., Gros, M.F., teRiele, H., Ehrlich, S.D. and Gruss, A.D. (1989). Replication origins of single-stranded DNA plasmid pUB110. *J. Bacteriol.* 171: 3366-3372.
- Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L. and Boyer, H.W. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-113.
- Bowater, R., Aboul-ela, F. and Lilley, D.M. (1991). Large-scale stable opening of supercoiled DNA in response to temperature and supercoiling in (A+T)-rich regions that promote low-salt cruciform extrusion. *Biochemistry* 30: 11495-11506.
- Brennan, C.A., Manthey, A.E. and Gumpert, R.I. (1983). Using T4 RNA ligase with DNA substrates. *Methods in Enzymology.* 100: 38-52.
- Bruand, C., Ehrlich, S.D. and Janni re, L. (1991). Unidirectional theta replication of the structurally stable *Enterococcus faecalis* plasmid pAM 1. *EMBO J.* 10: 2171-2177.
- Burdett, V. (1980). Identification of tetracycline resistant R-plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B). *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 753-760.
- Busch, S.J. and Sassone-Corsi, P. (1990). Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. *TIG.* 6: 36-40.
- Cereghino, J.L., Helinski, D.R. and Toukdarian, A.E. (1994). Isolation and characterization of DNA-binding mutants of a plasmid replication initiator protein utilizing an *in vivo* binding assay. *Plasmid* 31: 89-99.
- Chang, P.-C. and Cohen, S.N. (1994). Bidirectional replication from an internal origin in a linear *Streptomyces* plasmid. *Science* 265: 952-954.
- Chattoraj, D.K., Abeles, A.L. and Yarmolinsky, M.B. (1985). P1 plasmid maintenance: a paradigm of precise control. pp. 355-381. En: D.R. Helinski, S.N. Cohen, D.B. Clewell, D.A. Jackson and A. Hollaender (ed.). *Plasmids in bacteria*. Plenum Publishing Corp., New York.

Chen, D., Bowater, R. and Lilley, D.M.J. (1994). Topological promoter coupling in *Escherichia coli*: $\Delta topA$ -dependent activation of the *leu*-500 promoter on a plasmid. *J. Bacteriol.* **176**: 3757-3764.

Christiansen, K., Knudsen, B.R. and Westergaard, O. (1994). The covalent eukaryotic topoisomerase I-DNA intermediate catalyzes pH-dependent hydrolysis and alcoholysis. *J. Biol. Chem.* **269**: 11367-11373.

Coffey, A., Harrington, A., Kearney, K., Daly, C. and Fitzgerald, G. (1994). Nucleotide sequence and structural organization of the small, broad-host-range plasmid pCI411 from *Leuconostoc lactis* 533. *Microbiology* **140**: 2263-2269.

Colasanti, J. and Denhardt, D.T. (1987). Mechanism of replication of bacteriophage ϕ X174 XXII. Site-specific mutagenesis of the *A** gene reveals that *A** protein is not essential for ϕ X174 DNA replication. *J. Mol. Biol.* **197**: 47-54.

Currier, T. and Nester, E. (1976). Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Anal. Biochem.* **76**: 431-441.

de la Campa, A.G., del Solar, G. and Espinosa, M. (1990). Initiation of replication of plasmid pLS1. The initiator protein RepB acts on two distant DNA regions. *J. Mol. Biol.* **213**: 247-262.

del Solar, G. (1991). Replicación del plásmido de amplio espectro de huésped pLS1. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

del Solar, G., Acebo, P. and Espinosa, M. (1995a). Replication control of plasmid pLS1: efficient regulation of plasmid copy number is exerted by the combined action of two plasmid components, CopG and RNA II. *Mol. Microbiol.* **18**: (en prensa).

del Solar, G., de la Campa, A.G., Pérez-Martín, J., Choli, T. and Espinosa, M. (1989). Purification and characterization of RepA, a protein involved in the copy number control of plasmid pLS1. *Nucl. Acids Res.* **17**: 2405-2420.

del Solar, G., Díaz, R. and Espinosa, M. (1987a). Replication of the streptococcal plasmid pMV158 and derivatives in cell-free extracts of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 428-435.

del Solar, G. and Espinosa, M. (1992). The copy number of plasmid pLS1 is regulated by two trans-acting plasmid products: the antisense RNA II and the repressor protein, RepA. *Mol. Microbiol.* **6**: 83-94.

del Solar, G., Kramer, M.G., Ballester, S. and Espinosa, M. (1993a). Replication of the promiscuous plasmid pLS1: a region encompassing the minus origin of replication is associated with stable plasmid inheritance. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 97-105.

del Solar, G., Moscoso, M. and Espinosa, M. (1993b). In vivo definition of the functional origin of replication (*ori*(+)) of the promiscuous plasmid pLS1. *Mol. Gen. Genet.* **237**: 65-72.

del Solar, G., Moscoso, M. and Espinosa, M. (1993c). Rolling circle-replicating plasmids from Gram-positive and Gram-negative bacteria: a wall falls. *Mol. Microbiol.* **8**: 789-796.

del Solar, G., Pérez-Martín, J. and Espinosa, M. (1990). Plasmid pLS1-encoded RepA protein regulates transcription from *repAB* promoter by binding to a DNA sequence containing a 13-base pair symmetric element. *J. Biol. Chem.* **265**: 12569-12575.

del Solar, G., Puyet, A. and Espinosa, M. (1987b). Initiation signals for the conversion of single stranded to double stranded DNA forms in the streptococcal plasmid pLS1. *Nucl. Acids. Res.* **15**: 5561-5580.

del Solar, G. Ruiz-Echevarría, M.J., Espinosa, M. and Díaz, R. (1995b). Replication and maintenance of bacterial plasmids: molecular interactions and functional relationships. (enviado para publicar)

Dempsey, L.A., Birch, P. and Khan, S.A. (1992). Six amino acids determine the sequence-specific DNA binding and replication specificity of the initiator proteins of the pT181 family. *J. Biol. Chem.* **267**: 24538-24543.

Dempsey, L.A., Zhao, A.C. and Khan, S.A. (1995). Localization of the start sites of lagging strand replication of plasmids from gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **15**: 679-687.

Deng, Z., Keiser, T. and Hopwood, D. (1988). "Strong incompatibility" between derivatives of the *Streptomyces* multicopy plasmid pIJ101. *Mol. Gen. Genet.* **214**: 286-294.

Díaz, A., Lacks, S.A. and López, P. (1994). Multiple roles for DNA polymerase I in establishment and replication of the promiscuous plasmid pLS1. *Mol. Microbiol.* **14**: 773-783.

Dotto, G.P., Horiuchi, K. and Zinder, N.D. (1982). Initiation and termination of phage f1 plus-strand synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**: 7122-7126.

Dotto, G.P., Horiuchi, K. and Zinder, N.D. (1984). The functional origin of bacteriophage f1 DNA replication. Its signals and domains. *J. Mol. Biol.* **172**: 507-521.

Dower, W.J., Miller, J.F. and Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**: 6127-6145.

Eckstein, F. (1985). Nucleoside phosphorothioates. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 367-402.

Eguchi, Y., Itoh, T. and Tomizawa, J. (1991). Antisense RNA. *Ann. Rev. Biochem.* **60**: 631-652.

Eisenberg, S. and Finer, M. (1980). Cleavage and circularization of single-stranded DNA: a novel enzymatic activity of ϕ X174 A* protein. *Nucl. Acids Res.* **8**: 5305-5315.

- Espínosa, M., López, P., Pérez-Ureña, M.T. and Lacks, S.A. (1982). Interspecific plasmid, transfer between *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **188**: 195-201.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13.
- Fernández-Tresguerres, E., Martín, M., García de Viedma, D., Giraldo, R. and Díaz, R. (1995). Host growth temperature and a conservative amino acid substitution in the replication protein of pPS10 influence plasmid host range. *J. Mol. Biol.* **177**: 4377-4384.
- Fluit, A.C., Baas, P.D., van Boom, J.H., Veeneman, G.H., Jansz, H.S. (1984). Gene A protein cleavage of recombinant plasmids containing the ϕ X174 replication origin. *Nucl. Acids Res.* **12**: 6443-6454.
- Fried, M. and Crothers, D.M. (1981). Equilibria and kinetics of Lac repressor-operator interactions by polyacrilamide gel electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* **9**: 6505-6525.
- Fulford, W. and Model, P. (1988). Regulation of bacteriophage f1 DNA replication. I. New functions for genes II and X. *J. Mol. Biol.* **203**: 49-62.
- García de Viedma, D. (1994). Análisis de la proteína RepA del plásmido pPS10: interacciones y motivos implicados en autorregulación e inicio de replicación. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá. Madrid.
- Garner, M.M. and Rezvin, A. (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucl. Acids Res.* **9**: 3047-3060.
- Geider, K. and Kornberg, A. (1974). Conversion of the M13 viral strand to the double-stranded replicative forms by purified proteins. *J. Mol. Biol.* **249**: 3999-4005.
- Gennaro, M.L., Iordanescu, S., Novick, R.P., Murray, R.W., Steck, T.R. and Khan, S.A. (1989). Functional organization of the plasmid pT181 replication origin. *J. Mol. Biol.* **205**: 355-362.
- Gennaro, M.L. and Novick, R.P. (1986). *cmp*, a *cis*-acting plasmid locus that increases the interaction between replication origin and initiator protein. *J. Bacteriol.* **168**: 160-166.
- Gennaro, M.L. and Novick, R.P. (1988). An enhancer of DNA replication. *J. Bacteriol.* **170**: 5709-5717.
- Gielow, A., Diederich, L. and Messer, W. (1991). Characterization of a phage-plasmid hybrid (phasyl) with two independent origins of replication isolated from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 73-79.

- Gigliani, F., Ciotta, C., del Grosso, M.F. and Battaglia, P. (1993). pR plasmid replication provides evidences that single-stranded DNA induces the SDS system *in vivo*. *Mol. Gen. Genet.* **238**: 333-338.
- Gilbert, W. and Dressler, D. (1968). DNA replication: the rolling circle model. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **33**: 473-484.
- Giraldo, R. and Díaz, R. (1992). Differential binding of wild-type and a mutant RepA protein to *oriR* sequence suggests a model for the initiation of plasmid R1 replication. *J. Mol. Biol.* **228**: 787-802.
- Gough, G.W. and Lilley, D.M.J. (1985). DNA bending induced by cruciform formation. *Nature* **313**: 154-156.
- Greener, A., Filutowicz, M.S., McEachern, M.J. and Helinski, D.R. (1990). N-terminal truncated forms of the bifunctional π initiation protein express negative activity on plasmid R6K replication. *Mol. Gen. Genet.* **224**: 24-32.
- Greenstein, D. and Horiuchi, K. (1987). Interaction between the replication origin and the initiator protein of the filamentous phage f1. *J. Mol. Biol.* **197**: 157-171.
- Greenstein, D., Zinder, N.D. and Horiuchi, K. (1988). Integration host factor interacts with the DNA replication enhancer of filamentous phage f1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 6262-6266.
- Gros, M.-F., te Riele, H. and Ehrlich, S.D. (1987). Rolling circle replication of the single-stranded plasmid pC194. *EMBO J.* **6**: 3863-3869.
- Gruss, A.D. and Ehrlich, S.D. (1989). The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. *Microbiol. Rev.* **53**: 231-241.
- Gruss, A.D., Ross, H.F. and Novick, R.P. (1987). Functional analysis of a palindromic sequence required for normal replication of several staphylococcal plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2165-2169.
- Hanahan, D. (1983). Studies in transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hanai, R. and Wang, J.C. (1993). The mechanism of sequence-specific DNA cleavage and strand transfer by ϕ X174 gene A* protein. *J. Biol. Chem.* **268**: 23830-23836.
- Haring, V. and Scherzinger, E. (1989). In: Promiscuous plasmid of Gram-negative bacteria. Thomas, C.M. (ed.). Academic Press, London. pp. 95-124.
- Heidekamp, F., Baas, P.D., van Boom, J.H., Veeneman, G.H., Zipursky, S.L. and Jansz, H.S. (1981). Construction and characterization of recombinant plasmid DNAs containing sequences of the origin of bacteriophage ϕ X174 DNA replication. *Nucl. Acids Res.* **9**: 3335-3354.

- Hidaka, M., Akiyama, M. and Horiuchi, T.** (1988). A consensus sequence of three DNA replication terminus sites on the *E.coli* chromosome is highly homologous to the *terR* sites of the R6K plasmid. *Cell* **55**: 467-475.
- Higashitani, A., Greenstein, D., Hirokawa, H., Asano, S. and Horiuchi, K.** (1994). Multiple DNA conformational changes induced by an initiator protein precede the nicking reaction in a rolling circle replication origin. *J. Mol. Biol.* **237**: 388-400.
- Higashitani, A., Greenstein, D. and Horiuchi, K.** (1992). A single amino acid substitution reduces the superhelicity requirement of a replication initiator protein. *Nucl. Acids Res.* **20**: 2685-2691.
- Hinnebusch, J. and Tilly, K.** (1993). Linear plasmids and chromosomes in bacteria. *Mol. Microbiol.* **10**: 917-922.
- Horinouchi, S. and Weisblum, B.** (1982a). Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamine, and streptogramin type B antibiotics. *J. Bacteriol.* **150**: 804-814.
- Horinouchi, S. and Weisblum, B.** (1982b). Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.* **150**: 815-825.
- Horiuchi, K.** (1986). Interaction between gene II protein and the DNA replication origin of bacteriophage ϕ 1. *J. Mol. Biol.* **188**: 215-223.
- Hsiang, Y., Hertzberg, R., Hecht, S. and Liu, L.F.** (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **260**: 14873-14878.
- Ilyina, T.V. and Koonin, E.V.** (1992). Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eukaryotes and archaeobacteria. *Nucl. Acids Res.* **20**: 3279-3285.
- Ingmer, H. and Cohen, S.N.** (1993). Excess intracellular concentration of the pSC101 RepA protein interferes with both plasmid DNA replication and partitioning. *J. Bacteriol.* **175**: 7834-7841.
- Itoh, T. and Tomizawa, J.I.** (1980). Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 2450-2454.
- Jacob, R.J., Lebowitz, J. and Kleinschmidt, A.K.** (1974). Locating interrupted hydrogen bonding in the secondary structure of PM2 circular DNA by comparative denaturation mapping. *J. Virol.* **13**: 1176-1185.
- Keller, W.** (1975). Determination of the number of superhelical turns in simian virus 40 DNA by gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 4876-4880.

- Kelley, W.L., Patel, I. and Bastia, D. (1992). Structural and functional analysis of a replication enhancer: separation of the enhancer activity from origin function by mutational dissection of the replication origin γ of plasmid R6K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5078-5082.
- Khan, S.A., Carleton, S.M. and Novick, R.P. (1981). Replication of plasmid pT181 DNA *in vitro*: requirement for a plasmid-encoded product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 4902-4906.
- Khan, S.A. and Novick, R.P. (1983). Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline-resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **10**: 251-259.
- Kim, K. and Meyer, R.J. (1986). Copy number of broad host-range plasmid R1162 is regulated by a small RNA. *Nucl. Acids Res.* **14**: 8027-8046.
- Kim, J., Zwieb, C., Wu, C. and Adhya, S. (1989). Bending of DNA by gene-regulatory proteins: construction and use of a DNA bending vector. *Gene* **85**: 15-23.
- King, K.W. and Dybvig, K. (1992). Nucleotide sequence of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* plasmid pKMK1. *Plasmid* **28**: 86-91.
- Kingsman, A. and Willetts, N. (1978). The requirements for conjugal DNA synthesis in the donor strain during F *lac* transfer. *J. Mol. Biol.* **122**: 287-300.
- Kittell, B.L. and Helinski, D.R. (1992). In: Bacterial Conjugation (D.B.Clewell, ed.). Plenum Press, New York. pp. 223-242.
- Kleanthous, H., Clayton, C.L. and Tabaqchali, S. (1991). Characterization of a plasmid from *Helicobacter pylori* encoding a replication protein common to plasmids in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **5**: 2377-2389.
- Klein, J., Ulrich, C. and Plapp, R. (1993). Characterization and sequence analysis of a small cryptic plasmid from *Lactobacillus curvatus* LTH683, and its use for construction of new *Lactobacillus* cloning vectors. *Plasmid* **30**: 14-29.
- Knowles, J.R. (1980). Enzyme-catalyzed phosphoryl transfer reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **49**: 877-919.
- Koepsel, R.R. and Khan, S.A. (1986). Static and initiator protein-enhanced bending of DNA at a replication origin. *Science* **233**: 1316-1318.
- Koepsel, R.R. and Khan, S.A. (1987). Cleavage of single-stranded DNA by plasmid pT181-encoded RepC protein. *Nucl. Acids Res.* **15**: 4085-4097.
- Koepsel, R.R., Murray, R.W. and Khan, S.A. (1986). Sequence-specific interaction between the replication initiator protein of plasmid pT181 and its origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5484-5488.

- Koepsel, R.R., Murray, R.W., Rosenblum, W.D. and Khan, S.A. (1985). The replication initiator protein of plasmid pT181 has sequence-specific endonuclease and topoisomerase-like activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 6845-6849.
- Kollek, R., Oertel, W. and Goebel, W. (1980). Site-specific deletion at the replication origin of the antibiotic resistance factor R1. *Mol. Gen. Genet.* **177**: 413-419.
- Kornberg, A. and Baker, T.A. (1992). DNA replication. W.H. Freeman and Co. New York.
- Kramer, M.G., del Solar, G. and Espinosa, M. (1995). Lagging-strand origins of the promiscuous plasmid pMV158: physical and functional characterization. *Microbiology* **141**: 655-662.
- Kramer, B., Kramer, W. and Fritz, H.-J. (1984). Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E.coli*. *Cell* **38**: 879-887.
- Kuempel, P.L., Pelletier, A.J. and Hill, T.M. (1989). Tus and the terminators: the arrest of replication in prokaryotes. *Cell* **59**: 581-583.
- Kumar, C. and Novick, R.P. (1985). Plasmid pT181 replication is regulated by two small countertranscripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 638-642.
- Kunkel, T.A. and Seni, A. (1988). Exonucleolytic proofreading enhances the fidelity of DNA synthesis by chick embryo DNA polymerase- γ . *J. Biol. Chem.* **263**: 4450-4459.
- Kushner, S.R. (1978). An improved method for the transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids, 17-23. In H.B. Boyer, S. Nicosia (ed.). Genetic Engineering. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- Lacks, S.A. (1966). Integration-efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. *Genetics* **53**: 207-235.
- Lacks, S. and Greenberg, B. (1977). Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *J. Mol. Biol.* **114**: 153-168.
- Lacks, S.A., López, P., Greenberg, B. and Espinosa, M. (1986). Identification and analysis of genes for tetracycline resistance and replication functions in the broad-host-range plasmid pLS1. *J. Mol. Biol.* **192**: 753-765.
- Lahm, A., Weston, S.A. and Suck, D. (1992). X-ray structure of the DNase I-d(GGTATACC)₂ complex at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **226**: 1237-1256.
- Landschultz, W.H., Johnson, P.F. and McKnight, S.L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**: 1759-1764.

Langeveld, S.A., van Mansfeld, A.D.M., Baas, P.D., Jansz, H.S., van Arkel, G.A. and Weisbeek, P.J. (1978). Nucleotide sequence of the origin of replication in bacteriophage ϕ X174 RF DNA. *Nature* **271**: 417-420.

Langeveld, S.A., van Mansfeld, A.D.M., de Winter, J.M. and Weisbeek, P.J. (1979). Cleavage of single-stranded DNA by the A and A* proteins of bacteriophage ϕ X174. *Nucl. Acids Res.* **7**: 2177-2188.

Laue, T.M., Shah, B.D., Ridgeway, T.M. and Pelletier, S.L. (1992). Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. En *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science* (S.E. Harding, A.J. Rowe and J.C. Horton, Eds) pp 90-125, Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Laundon, C.H. and Griffith, J.D. (1987). Cationic metals promote sequence-directed DNA bending. *Biochemistry.* **26**: 3759-3762.

le Gouill, C., Parent, J-L., Rola-Pleszczynski, M. and Stankova, J. (1994). Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Analytical Biochemistry* **219**: 164.

Lee, S.B. and Bailey, J.E. (1984a). A mathematical model for lambda *dv* plasmid replication: analysis of wild-type plasmid. *Plasmid* **11**: 151-165.

Lee, S.B. and Bailey, J.E. (1984b). A mathematical model for lambda *dv* plasmid replication: analysis of copy number mutants. *Plasmid* **11**: 166-177.

Leenhouts, K.J., Tolner, B., Bron, S., Kok, J., Venema, G. and Seegers, J.F.M.L. (1991). Nucleotide sequence and characterization of the broad-host-range lactococcal plasmid pWV01. *Plasmid* **26**: 55-66.

Lehman, I.R. (1974). DNA ligase: structure, mechanism and function. *Science* **186**: 790-797.

Lilley, D.M.J. (1985). Dynamic, sequence-dependent DNA structure as exemplified by cruciform extrusion from inverted repeats in negatively supercoiled DNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **47**: 101-112.

Lindqvist, B.H., Dehó, G. and Calendar, R. (1993). Mechanisms of genome propagation and helper exploitation by satellite phage P4. *Microbiol. Rev.* **57**: 683-702.

Liu, L.F. and Wang, J.C. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 7024-7027.

López, P., Martínez, S., Díaz, A., Espinosa, M. and Lacks, S.A. (1989). Characterization of the *polA* gene of *Streptococcus pneumoniae* and comparison of the DNA polymerase I it encodes to homologous enzymes from *Escherichia coli* and phage T7. *J. Biol. Chem.* **264**: 4255-4263.

Lopilato, J., Bortner, S. and Beckwith, J. (1986). Mutations in a new chromosomal gene of *Escherichia coli* K-12, *pcnB*, reduce plasmid copy number of pBR322 and its derivatives. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 285-290.

Maciag, I.E., Viret, J.-F. and Alonso, J.C. (1988). Replication and incompatibility properties of plasmid pUB110 in *B.subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 232-240.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Mannarelli, B.M., Balganes, T.S., Greenberg, B., Springhorn, S.S. and Lacks, S.A. (1985). Nucleotide sequence of the *DnpII* DNA methylase gene of *Streptococcus pneumoniae* and its relationship to the *dam* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 4468-4472.

Marians, K.J., Ikeda, J.E., Schlagman, S. and Hurwitz, J. (1977). Role of DNA gyrase in ϕ X replicative-form replication *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 1965-1968.

Masai, M. and Arai, K.-I. (1987). RepA and DnaA proteins are required for initiation of R1 plasmid replication *in vitro* and interact with the *oriR* sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 4781-4785.

Masai, M. and Arai, K.-I. (1989). Leading strand synthesis of R1 plasmid replication *in vitro* is primed by primase alone at a specific site downstream of *oriR*. *J. Biol. Chem.* **264**: 8082-8090.

Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* **65**: 499-560. Grossman, L. & Moldave, K. (eds.). Academic Press, New York.

McEachern, M.J., Bott, M.A., Tooker, P.A. and Helinski, D.R. (1989). Negative control of plasmid R6K replication: Possible role of intermolecular coupling of replication origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 7942-7946.

McRorie, D.K. and Voelker, P.J. (1993). *Self-Associating Systems in the Analytical Ultracentrifuge*, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA.

Méndez, J., Blanco, L., Esteban, J.A., Bernad, A. and Salas, M. (1992). Initiation of ϕ 29 DNA replication occurs at the second 3' nucleotide of the linear template: a sliding-back mechanism for protein-primed DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 9579-9583.

Meyer, T.F., Bäuml, I., Geider, K. and Bedinger, P. (1981). Replication of phage fd RF with fd gene 2 protein and phage T4 enzymes. *J. Biol. Chem.* **256**: 5810-5813.

Meyer, T.F. and Geider, K. (1979). Bacteriophage fd gene II-protein. II. Specific cleavage and relaxation of supercoiled RF from filamentous phages. *J. Biol. Chem.* **254**: 12642-12646.

- Meyer, T.F. and Geider, K. (1982). Enzymatic synthesis of bacteriophage fd viral DNA. *Nature* **296**: 828-832.
- Meyer, T.F., Geider, K., Kurz, C. and Schaller, H. (1979). Cleavage site of bacteriophage fd gene 2 protein in the origin of viral strand replication. *Nature* **278**: 365-367.
- Miao, D-M., Honda, Y., Tanaka, K., Higashi, A., Nakamura, T., Taguchi, Y., Sakai, H., Komano, T. and Bagdasarian, M. (1993). A base-paired hairpin structure essential for the functional priming signal for DNA replication of the broad host range plasmid RSF1010. *Nucl. Acids Res.* **21**: 4900-4903.
- Michel, B. and Ehrlich, S.D. (1986). Illegitimate recombination occurs between the replication origin of the plasmid pC194 and a progressing replication fork. *EMBO J.* **5**: 3691-3696.
- Miller, J.H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Minden, J.S. and Marians, K.J. (1985). Replication of pBR322 DNA *in vitro* with purified proteins. Requirement for topoisomerase I in the maintenance of template specificity. *J. Biol. Chem.* **260**: 9316-9325.
- Minden, J.S. and Marians, K.J. (1987). *Escherichia coli* topoisomerase I can segregate replicating pBR322 daughter DNA molecules *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **261**: 11906-11917.
- Minton, A.P. (1994). Conservation of signal: a new algorithm for the elimination of the reference concentration as an independently variable parameter in the analysis of sedimentation equilibrium. En *Modern Analytical Ultracentrifugation* (T.M. Schuster and T.M. Laue, Eds.) pp 81-93, Birkhäuser, Boston.
- Miron, A., Mukherjee, S. and Bastia, D. (1992). Activation of distant replication origins *in vivo* by DNA looping as revealed by a novel mutant form of an initiator protein defective in cooperativity at a distance. *EMBO J.* **11**: 1205-1206.
- Mizuuchi, K. (1992). Polynucleotidyl transfer reactions in transpositional DNA recombination. *J. Biol. Chem.* **267**: 21273-21276.
- Mizuuchi, K. and Adzuma, K. (1991). Inversion of the phosphate chirality at the target site of Mu DNA strand transfer: evidence for a one-step transesterification mechanism. *Cell* **66**: 129-140.
- Moscoso, M., del Solar, G. and Espinosa, M. (1995a). Specific nicking-closing activity of the initiator of replication protein RepB of plasmid pMV158 on supercoiled or single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* **270**: 3772-3779.
- Moscoso, M., del Solar, G. and Espinosa, M. (1995b). In vitro recognition of the replication origin of pLS1 and of plasmids of the pLS1 family by the RepB initiator protein. *J. Bacteriol.* **177**: 7041-7049.

- Mukherjee, S., Patel, I. and Bastia, D.** (1985). Conformational changes in a replication origin induced by a initiator protein. *Cell* **43**: 189-197.
- Mukhopadhyay, G., Carr, K.M., Kaguni, J.M. and Chattoraj, D.K.** (1993). Open-complex formation by the host initiator, DnaA, at the origin of P1 plasmid replication. *EMBO J.* **12**: 4547-4554.
- Müller, A.K., Rojo, F. and Alonso, J.C.** (1995). The level of the pUB110 replication initiator protein is autoregulated, which provides an additional control for plasmid copy number. *Nucl. Acids Res.* **23**: 1894-1900.
- Murray, R.W., Koepsel, R.R. and Khan, S.A.** (1989). Synthesis of single-stranded plasmid pT181 DNA *in vitro* (initiation and termination of DNA replication). *J. Biol. Chem.* **264**: 1051-1057.
- Noirot, P., Bargonetti, J. and Novick, R.P.** (1990). Initiation of rolling circle replication in pT181 plasmid: initiator protein enhances cruciform extrusion at the origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 8560-8564.
- Noirot-Gros, M.F., Bidnenko, V. and Ehrlich, S.D.** (1994). Active site of the replication protein of the rolling circle plasmid pC194. *EMBO J.* **13**: 4412-4420.
- Nordström, K.** (1990). Control of plasmid replication- How do DNA iterons set the replication frequency? *Cell* **63**: 1121-1124.
- Nordström, K. and Austin, S.J.** (1989). Mechanisms that contribute to the stable segregation of plasmids. *Annu. Rev. Genet.* **23**: 37-69.
- Nordström, K., Molin, S. and Aagaard-Hansen, H.** (1980a). Partitioning of plasmid R1 in *Escherichia coli*: I. Kinetics of loss of plasmid derivatives deleted of the *par* region. *Plasmid* **4**: 215-227.
- Nordström, K., Molin, S. and Aagaard-Hansen, H.** (1980b). Partitioning of plasmid R1 in *Escherichia coli*: II. Incompatibility properties of the partitioning system. *Plasmid* **4**: 332-349.
- Nordström, K., Molin, S. and Light, J.** (1984). Control of replication of bacterial plasmids: genetics, molecular biology and physiology of the plasmid R1 system. *Plasmid* **12**: 71-90.
- Nordström, K. and Wagner, E.G.H.** (1994). Kinetic aspects of control of plasmid replication by antisense RNA. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 294-300.
- Novick, R.P.** (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* **51**: 381-395.
- Novick, R.P.** (1989). Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 537-565.

- Novick, R.P., Adler, G.K., Projan, S.J., Carleton, S., Highlander, S.K., Gruss, A., Khan, S.A. and Iordanescu, S. (1984). Control of pT181 replication I. The pT181 copy control function acts by inhibiting the synthesis of a replication protein. *EMBO J.* **3**: 2399-2405.
- Novick, R.P., Iordanescu, S., Projan, S.J., Kornblum, J. and Edelman, I. (1989). pT181 plasmid replication is regulated by a countertranscript-driven transcriptional attenuator. *Cell* **59**: 395-404.
- Ozaki, E., Yasukawa, H. and Masamune, Y. (1994). Purification of pKYM-encoded RepK, a protein required for the initiation of plasmid replication. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **40**: 365-375.
- Pal, S.K. and Chattoraj, D.K. (1988). P1 plasmid replication: initiator sequestration is inadequate to explain control by initiator-binding sites. *J. Bacteriol.* **170**: 3554-3560.
- Pansegrau, W., Schröder, W. and Lanka, E. (1993). Relaxase (Tra I) of IncP α plasmid RP4 catalyzes a site-specific cleaving-joining reaction of single-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 2925-2929.
- Pansegrau, W., Schröder, W. and Lanka, E. (1994). Concerted action of three distinct domains in the DNA cleaving-joining reaction catalyzed by relaxase (TraI) of conjugative plasmid RP4. *J. Biol. Chem.* **269**: 2782-2789.
- Pansegrau, W., Ziegelin, G. and Lanka, E. (1990). Covalent association of the *tral* gene product of plasmid RP4 with the 5'-terminal nucleotide at the relaxation nick site. *J. Biol. Chem.* **265**: 10637-10644.
- Peacock, A.C. and Dingman, C.W. (1968). Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrilamide composite gels. *Biochemistry* **7**: 668-674.
- Peeters, B.P.H., Peters, R.M., Schoenmakers, J.G.G. and Konings, R.N.H. (1985). Nucleotide sequence and genetic organization of the genome of the N-specific filamentous bacteriophage IKE; comparison with the genome of the F-specific filamentous phages M13, fd and f1. *J. Mol. Biol.* **181**: 27-39.
- Peeters, B.P.H., Schoenmakers, J.G.G. and Konings, R.N.H. (1986). The gene II proteins of the filamentous phage IKE and Ff (M13, fd and f1) are not functionally interchangeable during viral strand replication. *Nucl. Acids Res.* **14**: 5067-5080.
- Pérez-Martín, J., del Solar, G., de la Campa, A. and Espinosa, M. (1988). Three regions in the DNA of plasmid pLS1 show sequence-directed static bending. *Nucl. Acids Res.* **16**: 9113-9126.
- Poljak, L.G. and Gralla, J.D. (1987). The SV40 termination region exhibits an altered helical conformation. *Nucl. Acids Res.* **15**: 5433-5442.
- Priebe, S.D. and Lacks, S.A. (1989). Region of the streptococcal plasmid pMV158 required for conjugative mobilization. *J. Bacteriol.* **171**: 4778-4784.

- Pritchard, R.H., Barth, P.T. and Collins, J.** (1969). Control of DNA synthesis in bacteria. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **19**: 263-297.
- Projan, S.J., Carleton, S. and Novick, R.P.** (1983). Determination of plasmid copy number by fluorescence densitometry. *Plasmid* **9**: 182-190.
- Projan, S.J. and Novick, R.P.** (1988). Comparative analysis of five related staphylococcal plasmids. *Plasmid* **19**: 203-221.
- Puyet, A., del Solar, G. and Espinosa, M.** (1988). Identification of the origin and direction of replication of the broad-host-range plasmid pLS1. *Nucl. Acids Res.* **16**: 115-133.
- Raleigh, E.A., Lech, K. and Brent, R.** (1989). Current Protocols in molecular biology. Ed. Ausnted, F.M. Publishing Associates and Wiley Interscience. New York.
- Rasched, I. and Oberer, E.** (1986). Ff coliphages: Structural and functional relationships. *Microbiol. Rev.* **50**: 401-427.
- Rasooly, A. and Novick, R.P.** (1993). Replication-specific inactivation of the pT181 plasmid initiator protein. *Science* **262**: 1048-1050.
- Rasooly, A., Projan, S.J. and Novick, R.P.** (1994a). Plasmids of the pT181 family show replication-specific initiator protein modification. *J. Bacteriol.* **176**: 2450-2453.
- Rasooly, A., Wang, P-Z. and Novick, R.P.** (1994b). Replication-specific conversion of the *Staphylococcus aureus* pT181 initiator protein from an active homodimer to an inactive heterodimer. *EMBO J.* **13**: 5245-5251.
- Roca, J.** (1995). The mechanisms of DNA topoisomerases. *TIBS.* **20**: 156-160.
- Ron, D. and Habener, J.F.** (1992). CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* **6**: 439-453.
- Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D.-S., Lin, S.-W., Dunn, J.J. and Studier, F.W.** (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56**: 125-135.
- Ryder, K., Silver, S., de Lucia, A., Fanning, E. and Tegtmeyer, P.** (1986). An altered DNA conformation in origin region I is a determinant for binding of SV40 large T antigen. *Cell* **44**: 719-725.
- Salas, M.** (1991). Protein-priming of DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 39-71.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.

- Scherzinger, E., Haring, V., Lurz, R. and Otto, S. (1991). Plasmid RSF1010 DNA replication *in vitro* promoted by purified RSF1010 RepA, RepB and RepC proteins. *Nucl. Acids Res.* **19**: 1203-1211.
- Scherzinger, E., Lurz, R., Otto, S. and Dobrinski, B. (1992). In vitro cleavage of double- and single-stranded DNA by plasmid RSF1010-encoded mobilization proteins. *Nucl. Acids Res.* **20**: 41-48.
- Seelke, R., Kline, B., Aleef, R., Porter, R.D. and Schields, M.S. (1987). Mutations in the *recD* gene of *Escherichia coli* that raise the copy number of certain plasmids. *J. Bacteriol.* **169**: 4841-4844.
- Selick, H.E., Barry, J., Cha, T-A., Munn, M., Nakanishi, M., Wong, M.L. and Alberts, B.M. (1987). In: DNA replication and recombination. McMacken, R. and Kelly, T.J. (eds). UCLA, Alan R. Liss, Inc. New York. pp. 183-214.
- Singleton, C.K. and Wells, R.D. (1982). The facile generation of covalently closed circular DNAs with defined negative superhelical densities. *Analytical Biochemistry.* **122**: 253-257.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Sozhamannan, S., Dabert, P., Moretto, V., Ehrlich, S.D. and Gruss, A. (1990). Plus-origin mapping of single-stranded DNA plasmid pE194 and nick site homologies with other plasmids. *J. Bacteriol.* **172**: 4543-4548.
- Stassi, D.L., López, P., Espinosa, M. and Lacks, S.A. (1981). Cloning of chromosomal genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 7028-7032.
- Staudenbauer, W.L. (1978). Structure and replication of the colicin E1 plasmid. *Currents Topics Microbiol. Immunol.* **83**: 93-156. Springer-Verlag, Berlin.
- Stenzel, T.T., MacAllister, T. and Bastia, D. (1991). Cooperativity at a distance promoted by the combined action of two replication initiator proteins and a DNA bending protein at the replication origin of pSC101. *Genes & Development* **5**: 1453-1463.
- Stenzel, T.T., Patel, P. and Bastia, D. (1987). The integration host factor of *Escherichia coli* binds to bent DNA at the origin of replication of the plasmid pSC101. *Cell* **49**: 709-717.
- Steuber, D. and Bujard, H. (1982). Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes. *EMBO J.* **1**: 1399-1404.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986). Selective expression of cloned genes directed by T7 RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.

- te Riele, H., Michel, B. and Ehrlich, S.D. (1986). Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**: 2541-2545.
- Tessman, E.S. (1966). Mutants of bacteriophage S13 blocked in infectious DNA synthesis. *J. Mol. Biol.* **17**: 218-236.
- Tessier, D.C., Brousseau, R. and Vernet, T. (1986). Ligation of single-stranded oligodeoxyribonucleotides by T4 RNA ligase. *Analytical Biochemistry*. **158**: 171-178.
- Thomas, C.D., Balson, D.F. and Shaw, W. (1988). Identification of the tyrosine residue involved in bond formation between replication origin and initiator protein of plasmid pC221. *Biochemical Society Transactions*. **16**: 758-759. 626th Meeting, Sheffield.
- Thomas, C.D., Balson, D.F. and Shaw, W. (1990). In vitro studies of the initiation of staphylococcal plasmid replication. Specificity of RepD for its origin (*oriD*) and characterization of the Rep-*ori* tyrosyl ester. *J. Biol. Chem.* **265**: 5519-5530.
- Thomas, C.D., Nikiforov, T.T., Connolly, B.A. and Shaw, W.V. (1995). Determination of sequence specificity between a plasmid replication initiator protein and the origin of replication. *J. Mol. Biol.* **254**: 381-391.
- Tinoco, I., Borfr, P.N., Dengler, B., Levine, M.D., Uhlenbeck, O.C., Crothers, D.M. and Gralla, J. (1973). Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. *Nature New Biology* **246**: 40-41.
- Trawick, J.D. and Kline, B.C. (1985). A two-stage molecular model for control of mini-F replication. *Plasmid* **13**: 59-69.
- Tsutsui, H., Fujiyama, A., Murotsu, T. and Matsubara, K. (1983). Role of nine repeating sequences of the mini-F genome for expression of F-specific incompatibility phenotype and copy number control. *J. Bacteriol.* **155**: 337-344.
- van der Ende, A., Teertstra, R. and Weisbeek, P.J. (1982). Initiation and termination of the bacteriophage ϕ X174 rolling circle DNA replication *in vivo*: packaging of plasmid single-stranded DNA into bacteriophage ϕ X174 coats. *Nucl. Acids Res.* **10**: 6849-6863.
- van der Lelie, D., Bron, S., Venema, G. and Oskam, L. (1989). Similarity of minus origins of replication and flanking open reading frames of plasmids pUB110, pTB913 and pMV158. *Nucl. Acids Res.* **17**: 7283-7294.
- van Mansfeld, A.D.M., Langeveld, S.A., Baas, P.D., Jansz, H.S., van der Marel, G.A., Veeneman, G.H. and van Boom, J.H. (1980). Recognition sequence of bacteriophage ϕ X174 gene A protein- an initiator of DNA replication. *Nature* **288**: 561-566.
- van Mansfeld, A.D.M., van Teeffelen, H.A.A.M., Fluit, A.C., Baas, P.D. and Jansz, H.S. (1986). Effect of SSB protein on cleavage of single-stranded DNA by ϕ X gene A and A* protein. *Nucl. Acids Res.* **14**: 1845-1861.

- Villafane, R., Bechhofer, D., Narayan, C. and Dubnau, D.A. (1987). Replication control genes of plasmid pE194. *J. Bacteriol.* **169**: 4822-4829.
- Vujcic, M. and Topisirovic, L. (1993). Molecular analysis of the rolling-circle replicating plasmid pA1 of *Lactobacillus plantarum* A112. *Appl. Environm. Microbiol.* **59**: 274-280.
- Wagner, E.G.H. and Simons, R.W. (1994). Antisense RNA control in bacteria, phages, and plasmids. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 713-742.
- Wang, J.C. (1985). DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 665-697.
- Wang, P., Projan, S.J., Henriquez, V. and Novick, R.P. (1992). Specificity of origin recognition by replication initiator protein in plasmids of the pT181 family is determined by six amino acid residues element. *J. Mol. Biol.* **223**: 145-158.
- Wang, P., Projan, S.J., Henriquez, V. and Novick, R.P. (1993). Origin recognition specificity in pT181 plasmids is determined by a functionally asymmetric palindrome DNA-element. *EMBO J.* **12**: 45-52.
- Waters, V.L. and Guiney, D.G. (1993). Processes at the nick region link conjugation, T-DNA transfer and rolling-circle replication. *Mol. Microbiol.* **9**: 1123-1130.
- Waters, V.L., Hirata, K.H., Pansegrau, W., Lanka, E. and Guiney, D.G. (1991). Sequence identity in the nick regions of IncP plasmid transfer origins and T-DNA borders of *Agrobacterium* Ti plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 1456-1460.
- Womble, D.D. and Rownd, R.H. (1986). Regulation of IncfII plasmid DNA replication: A quantitative model for control of plasmid NR1 replication in the bacterial cell division cycle. *J. Mol. Biol.* **192**: 529-548.
- Wu, H.-M. and Crothers, D.M. (1984) The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. *Nature* **308**: 509-513.
- Xu, F., Pearce, L.E. and Yu, P.-K. (1991). Genetic analysis of a lactococcal plasmid replicon. *Mol. Gen. Genet.* **227**: 33-39.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yasukawa, H., Hase, T., Sakai, A. and Masamune, Y. (1991). Rolling-circle replication of the plasmid pKYM isolated from a Gram-negative bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 10282-10286.
- Yasukawa, H., Ozaki, E., Morito, S. and Masamune, Y. (1994). Initiation and termination of DNA replication of plasmid pKYM via a rolling-circle mechanism. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **40**: 377-388.

Zahn, K. and Blattner, F.R. (1985a). Sequence-induced DNA curvature at the bacteriophage λ origin of replication. *Nature* **317**: 451-453.

Zahn, K. and Blattner, F.R. (1985b). Binding and bending of the λ replication origin by the phage O protein. *EMBO J.* **4**: 3605-3616.

Ziegelin, G., Scherzinger, E., Lurz, R. and Lanka, E. (1993). Phase P4 α -protein is multifunctional with origin recognition, helicase and primase activities. *EMBO J.* **12**: 3703-3708.